Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005170

International filing date: 22 March 2005 (22.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP

Number: 2005-029360

Filing date: 04 February 2005 (04.02.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in

compliance with Rule 17.1(a) or (b)



日 本 国 特 許 庁 JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

2005年 2月 4日 Date of Application:

願 番 号

特願2005-029360 Application Number:

パリ条約による外国への出願 に用いる優先権の主張の基礎 となる出願の国コードと出願 番号

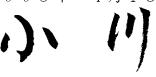
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is JP2005-029360

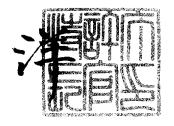
出 願 人

チッソ株式会社 Applicant(s): 藤森工業株式会社

> 2005年 4月13日

特許庁長官 Commissioner, Japan Patent Office





```
【書類名】
               特許願
【整理番号】
               P-C50037
【あて先】
               特許庁長官
                       殿
【国際特許分類】
               C 0 7 K 1 4 / 7 4 5
【発明者】
  【住所又は居所】
               東京都中央区日本橋馬喰町一丁目4番16号 藤森工業株式会社
               本社内
               細川 和也
  【氏名】
【発明者】
  【住所又は居所】
               東京都中央区日本橋馬喰町一丁目4番16号 藤森工業株式会社
               本社内
  【氏名】
               鹿島 甲介
【特許出願人】
  【識別番号】
               0 0 0 0 0 0 2 0 7 1
  【氏名又は名称】
               チッソ株式会社
【特許出願人】
  【識別番号】
               0 0 0 2 2 4 1 0 1
  【氏名又は名称】
               藤森工業株式会社
【代理人】
  【識別番号】
               100100549
  【弁理士】
  【氏名又は名称】
               川口 嘉之
  【電話番号】
               03-3669-6571
  【連絡先】
               担当
【選任した代理人】
  【識別番号】
               100090516
  【弁理士】
  【氏名又は名称】
              松倉
                  秀実
【選任した代理人】
  【識別番号】
               100089244
  【弁理士】
  【氏名又は名称】
              遠山 勉
【先の出願に基づく優先権主張】
  【出願番号】
               特願2004-80950
  【出願日】
              平成16年 3月19日
【先の出願に基づく優先権主張】
  【出願番号】
               特願2004-170346
  【出願日】
               平成16年 6月 8日
【先の出願に基づく優先権主張】
  【出願番号】
               特願2004-217834
  【出願日】
               平成16年 7月26日
【先の出願に基づく優先権主張】
  【出願番号】
               特願2004-315631
  【出願日】
              平成16年10月29日
【手数料の表示】
  【予納台帳番号】
              1 9 2 3 7 2
  【納付金額】
               16,000円
【提出物件の目録】
  【物件名】
               特許請求の範囲
```

明細書

【物件名】

 【物件名】
 図面 1

 【物件名】
 要約書 1

 【包括委任状番号】
 9712150

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

野生型トロンビンのアミノ酸を1個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下であるトロンビン誘導体。

【請求項2】

トロンビン基質結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である請求項1に記載のトロンビン誘導体。

【請求項3】

ヒルジンC末端ペプチド結合能を有する請求項1に記載のトロンビン誘導体。

【請求項4】

トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である請求項1に記載のトロンビン誘導体。

【請求項5】

ヘバリン結合能が野生型トロンビンと同程度である請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項6】

0.1 MoNaClを含む pH7.4の50 mMトリス塩酸中でトロンビン基質と $37 \text{ } \mathbb{C}$ で 3 時間反応させたときに分解されるトロンビン基質の割合が10%以下である請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項7】

トロンビン基質が血液凝固第13因子である請求項6に記載のトロンビン誘導体。

【請求項8】

トロンビン基質がトロンビンレセプター細胞外ドメインのペプチドである請求項6に記載のトロンビン誘導体。

【請求項9】

トロンビン基質がフィブリノゲンである請求項6に記載のトロンビン誘導体。

【請求項10】

0.1 MのNaClを含むpH7.4の50mMトリス塩酸に溶解した1mg/mlフィブリノゲン溶液に、終濃度が0.1mg/mlになるように加えて、37C、3時間インキュベーションしたときにフィブリンクロットを形成させない請求項 $1\sim6$ の何れか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項11】

トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である請求項1~10のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項12】

抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である請求項1~10のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項13】

フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である請求項1~10のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項 1 4】

抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である請求項1~10のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項15】

トロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に2倍以上に高まった請求項1~10のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項16】

トロンビンレセプターまたは血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に2倍以上に高まった請求項 $1 \sim 10$ のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項17】

野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、請求項1~16のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項18】

ヒト野生型トロンビンが配列番号2のアミノ酸配列を含む蛋白質である請求項17に記載のトロンビン誘導体。

【請求項19】

カルボキシル基が修飾された請求項1~18のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項20】

アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された請求項 1 9 記載のトロンビン誘導体。

【請求項21】

ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項 1 9 記載のトロンビン誘導体。

【請求項22】

アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項1 9記載のトロンビン誘導体。

【請求項23】

前記ポリエチレングリコールが分子量1000以下のポリエチレングリコールである、請求項21または22記載のトロンビン誘導体。

【請求項24】

カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された請求項19に記載のトロンビン誘導体。

【請求項25】

一分子当たり少なくとも3個以上のカルボキシル基が修飾された請求項19~24のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項26】

一分子当たり25個以下のカルボキシル基が修飾された請求項19~24のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項27】

少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された請求項19~26 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項28】

血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した請求項 1 9 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項29】

血小板のGPIb α 拮抗能を有する請求項 $19 \sim 27$ のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項30】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスバラギン酸から選ばれた少なくとも2つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項31】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも1つのアミノ酸と、B鎖の205番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項32】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、グリシン、およびシステインのいずれかである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項33】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がグリシンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項34】

B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がアラニンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項35】

B鎖の203番目のグリシンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、およびセリンのいずれかである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項36】

B鎖の99番目のアスパラギン酸を置換するアミノ酸が、アスパラギンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項37】

B鎖の43番目のヒスチジンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはアスパラギンである請求項30または31に記載のトロンビン誘導体。

【請求項38】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、少なくともB鎖の203番目のグリシンとB鎖の205番目のセリン置換されたトロンビンであって、該205番目のセリンがグリシンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項39】

B鎖の203番目のグリシンがアラニンに置換された、請求項38に記載のトロンビン誘導体。

【請求項40】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン及びB鎖の43番目のヒスチジンが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項41】

B鎖の205番目のセリンを置換する他のアミノ酸がグリシン、アラニン、スレオニン、システインのいずれかである、請求項40に記載のトロンビン誘導体。

【請求項42】

野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリンがアラニンに置換され、B鎖の43番目のヒスチジンがアラニンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。

【請求項43】

さらに、ナトリウム結合部位のアミノ酸が置換された、請求項30~42のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項44】

ナトリウム結合部位のアミノ酸がB鎖の232番目又は234番目のアスパラギン酸である請求項43に記載のトロンビン誘導体。

【請求項45】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、ヒルジンC末端ペプチド結合能が野生型トロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項46】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である請

求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項47】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項48】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項49】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項50】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項51】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項52】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項53】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に2倍以上に高まった請求項 $30\sim44$ のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項54】

さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に2倍以上に高まった請求項30~44のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項55】

置換されるアミノ酸がB鎖の77番目のリシンである請求項47~54のいずれか一項に 記載のトロンビン誘導体。

【請求項56】

B鎖の77番目のリシンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはグルタミン酸である請求項55に記載のトロンビン誘導体。

【請求項57】

置換されるアミノ酸がB鎖の24番目のグルタミンである請求項47~54のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項58】

野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、請求項30~57のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項59】

ヒト野生型トロンビンが配列番号 2 のアミノ酸配列を含む蛋白質である請求項 5 8 に記載のトロンビン誘導体。

【請求項60】

カルボキシル基が修飾された請求項30~59のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体

【請求項61】

アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された請求項60記載のトロンビン誘導体。

【請求項62】

ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項60記載のトロンビン誘導体。

【請求項63】

アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された請求項 6 0 記載のトロンビン誘導体。

【請求項64】

前記ポリエチレングリコールが分子量1000以下のポリエチレングリコールである、請求項62または63記載のトロンビン誘導体。

【請求項65】

カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された請求項60に記載のトロンビン誘導体。

【請求項66】

一分子当たり少なくとも3個以上のカルボキシル基が修飾された請求項60~65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項67】

一分子当たり25個以下のカルボキシル基が修飾された請求項60~65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項68】

少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された請求項60~67 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項69】

血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した請求項60~68のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項70】

血小板のGPIb α 拮抗能を有する請求項 6 0 \sim 6 8 のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

【請求項71】

請求項1~29のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体をコードするDNA。

【請求項72】

請求項30~59のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体をコードするDNA。

【請求項73】

請求項1~70のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体を含有する医薬組成物。

【請求項74】

抗血栓剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項75】

抗炎症剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項76】

血小板凝集抑制剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項77】

血小板粘着抑制剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項78】

内因系血液凝固抑制剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項79】

トロンビンレセプター活性化抑制剤である請求項73に記載の医薬組成物。

【請求項80】

抗血液凝固作用と抗血小板作用の両方を有する請求項73に記載の医薬組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】トロンビン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物

【技術分野】

$[0\ 0\ 0\ 1\]$

本発明は、トロンビン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物、特に抗血栓剤、抗炎症剤に関する。

【背景技術】

[0002]

トロンビンは血小板凝集反応や炎症反応などを担う、トリプシンと非常に相同性の高いトリプシン様のセリンプロテアーゼである。例えば、非特許文献1には、トロンビンが、基質であるトロンビンレセプターを活性化することによって血小板凝集反応、血管内皮細胞活性化、炎症反応を起こすことが記載されている。

[0003]

$[0\ 0\ 0\ 4\]$

これらをもとに、抗血栓剤等の開発のために、様々なトロンビンの修飾・改変が試みられている。特許文献 1 には、セリンプロテアーゼと競争してセリンプロテアーゼの基質に結合することによって、該セリンプロテアーゼと該基質との反応を抑制する物質(以下「反応抑制物質」と言うことがある)を含有するセリンプロテアーゼ抑制剤が開示されている。さらに該文献には、このセリンプロテアーゼ抑制剤は、抗血栓剤(血栓形成抑制剤)として有効であることが記載されている。該文献には、該反応抑制物質の具体例として、セリンプロテアーゼであるトロンビンと、フェニルメチルスルフォニルフルオリド(以下「PMSF」と言うことがある)などの阻害剤とを反応させ、活性部位に存在するセリンをデヒドロアラニンに転換すること(以下「アンヒドロ化」と言うことがある)により、セリンプロテアーゼ活性が著しく低下したトロンビン誘導体(以下「AHT」と言うことがある)が開示されている。

[0005]

また、特許文献2には、アンヒドロトロンビンのカルボキシル基とイミドとを反応させ、アンヒドロトロンビンを化学的に修飾したアンヒドロトロンビン誘導体(以下「MーAHT」と言うことがある)が開示されている。MーAHTは、血液中に大量に存在するフィブリノゲンへの結合能が選択的に低いことから、AHTに較べて部分活性化トロンボプラスチン時間(APTT)延長効果が飛躍的に増加し高い抗血栓効果を有する。

$[0\ 0\ 0\ 6\]$

一方で、アミノ酸置換を有するトロンビン誘導体の研究も行われている。トロンビンの 遺伝子組み換えによる活性中心の置換体はこれまで下記のように幾つかの検討がなされて きた。

$[0\ 0\ 0\ 7\]$

例えば、非特許文献 5 には活性中心セリンをアラニンに置換したトロンビンを作製し白血球への影響が述べられている。この誘導体の活性に関しては活性を失ったトロンビン組

[0008]

その他のトロンビン誘導体については、特許文献3、非特許文献7~9に開示されるように、遺伝子工学的にアミノ酸置換を導入することによって基質活性化能を有したまま抗血液凝固効果を持つようになったトロンビン誘導体が報告されている。これらに開示されるトロンビン誘導体はトロンボモジュリン特異性が保持または増強されており、且つフィブリノゲン分解能が著しく低下した誘導体であり、トロンボモジュリンに特異的に結合しプロテイン(を活性化する事で抗血栓性を有する誘導体である。

特許文献4には、活性中心のアミノ酸が置換され、さらにヒルジンを中和する事で抗凝 固を抑制するプロトロンビン誘導体が開示されている。

特許文献 5 , 6 には、活性中心セリンがアラニンに置換されたトロンビン、及び活性中心セリンがアラニンに、かつ活性中心アスパラギン酸がアスパラギンに置換されたトロンビンが、洗浄血小板懸濁液中においてトロンビンによるトロンビンレセプターへの刺激を抑制した事が記載されている。

しかしながら、これら報告のアミノ酸置換によって得られるトロンビン誘導体は血液中に多量に存在するフィブリノゲンと強い親和性を持つため、加えたトロンビン誘導体の殆どがフィブリノゲンに結合してしまい、抗トロンビンレセプター効果を得るために多量の投与が必要となり、血液中で抗トロンビンレセプター剤(抗血小板剤)として使用することは実質的には不可能であった。

【特許文献1】国際公開第01/03740号バンフレット

【特許文献2】国際公開第02/077031号パンフレット

【特許文献 3 】 特表平 0 9 - 5 0 9 0 4 5 号 公報

【特許文献4】特表平11-507542号公報

【特許文献5】特表平6-508742号公報

【特許文献 6 】 特開 2 0 0 3 - 1 5 9 0 8 8 号公報

【非特許文献 1 】 J. Biol. Chem. 261(1986)15928-15933

【非特許文献2】日本血栓止血学会誌 第10巻 2,3号(1999)

【非特許文献3】 Biochemical J. (2001) 354.309-313

【非特許文献4】ヴォート生化学 上巻 1996年 p331-340 東京化学 同人

【非特許文献5】Experimental cell research 219, 650-656(1995)

【非特許文献6】 Biochimica et Biophyscia Acta 1451(1999) 173-186

【非特許文献7】 J. Biol. Chem Vol. 275, 39827-39830

【非特許文献8】 J. Biol. Chem Vol. 279, 26387-26394

【非特許文献9】 J. Biol. Chem Vol. 277, 27581-27584

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

[0009]

AHTやM-AHTのように化学的手法により得られたトロンビン誘導体は、抗血栓効果や抗炎症効果を有しているが、セリンプロテアーゼ活性にばらつきがあり、AHTへ変換する際のアルカリ処理、再生処理等の多工程を必要とし、回収率も50から60%と十分ではないという改善すべき点があった。

また、M-AhTにおいても微量に存在する残存トロンビン活性が、その抗凝固能を低下させる問題点があった。

$[0\ 0\ 1\ 0]$

また、従来トロンビンにおいて報告されている多くの配列において活性中心のトロンビン置換体を作成したところ、抗血栓、抗炎症剤としての十分な機能を有していなかった。理由として、これら報告の置換体は抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において実質的なトロンビン基質分解活性を有する、あるいは置換による影響で主にエクソサイト I の構造変化にともないトロンビン基質結合能が著しく低下している等の問題が考えられた。例えばBiochimica et Biophyscia Acta 1451(1999) 173-186の中で活性が完全に喪失したと報告されるB鎖203グリシンをアラニンに置換したトロンビンにおいても、本発明で定義される抗血栓、抗炎症剤として用いる目的においての実質的なトロンビン基質分解活性が残存していた。さらにB鎖203グリシン及び活性中心ヒスチジン及びアスバラギン酸の置換は活性をより低下させるものの、その組み合わせによってはエクソサイト I の構造変化を招きトロンビン基質結合能が損なわれる場合があった。

本発明は、基質分解活性を実質的に欠き、且つ血栓形成に重要なトロンビン基質に特異的に結合することにより、生体に投与した場合に実質的に抗血栓、抗炎症剤として使用可能なトロンビン誘導体を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

$[0\ 0\ 1\ 1]$

本発明者は前述の従来技術の問題点に鑑み鋭意研究を重ねた。その結果、トロンビンのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が、遺伝子組換操作により置換されたトロンビンであり且つ抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において実質的にトロンビン基質を分解しないレベルに活性が低下していれば、AHT同様のAPTT延長を主効果とした抗血栓症効果が得られる事を見出した。さらに本発明で測定される基質活性化能を完全に失っている誘導体であればインキュベーションに影響を受けることなく確実にAPTTが延長されること、さらに、血栓形成に重要なトロンビン基質に対しより特異的な結合能を有していれば、より確実にAHT以上の抗血栓、抗炎症効果が得られる事を見出した。

$[0\ 0\ 1\ 2]$

また、トロンビンの活性中心の置換方法についてさらなる検討を行ったところ、トロンビン誘導体において活性中心セリンの置換はアラニン、スレオニン、グリシン、システインへの置換であればエクソサイト | の構造が保持されトロンビン基質結合能が保たれることを見出した。

さらに、B鎖の205番目のセリン(活性中心セリン)、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン(活性中心ヒスチジン)、および99番目のアスパラギン酸(活性中心アスパラギン酸)から選ばれた少なくとも2つのアミノ酸を最適な組み合わせに置換することにより、エクソサイト | の構造及びトロンビン基質結合能を保持し、且つ抗血栓、抗炎症剤として用いる目的において実質的なトロンビン基質分解活性を喪失した、抗血栓、抗炎症効果を持ったトロンビン誘導体が得られる事を見出した。

上記置換の中でも、例えば、活性中心セリン及び活性中心ヒスチジンの置換により、トロンビン基質認識性が変化し、(主として血液凝固VIII因子特異性が向上(フィブリノゲン特異性が低下)する)、他の活性中心のアミノ酸を置換したトロンビン誘導体に比較して、低濃度においても主に血液凝固カスケード(特に部分活性化トロンボプラスチン時間(APTT))特異的な抗血栓効果を発揮するトロンビン誘導体が得られる事を見出した。

$[0\ 0\ 1\ 3\]$

本発明者はまた、上記誘導体のナトリウム結合領域を置換あるいは修飾することによってさらにトロンビン基質分解活性を低下させることができることを見出した。

さらに、上記アミノ酸置換以外のさらなる置換によって、血中に多量に存在するフィブリノゲンに対するトロンビン誘導体の親和性を、トロンビンレセプター又は血液凝固第8因子に対し相対的に低下させることにより、トロンビン基質特異性がさらに限定され、より少ない投与量によって良好な抗血栓効果を得ることができることを見出した。

さらなるアミノ酸置換によって得られるトロンビン誘導体の中でも、高いAPTT延長効果を持つが抗血小板機能は低いタイプ、及び高いAPTT延長効果と高い抗血小効果(但しPARI 阻害効果のみ)を示すタイプ等の種々の特徴を有した誘導体が作製できることを見出した

さらに、上記アミノ酸置換に加え、トロンビン誘導体が持つ抗血栓性を損なうことなく、トロンビン誘導体のトロンボモジュリン親和性を特異的に低下させることで、生体投与されたトロンビン誘導体が血管内皮細胞上でトロンボモジュリンに結合し、本来生体内で起こるトロンビンによるトロンボモジュリン上におけるプロテイン(の活性化を抑制することを防ぐことができ、より有効な抗血栓剤として機能しうる事を見出した。

また、国際公開第02/077031号パンフレット記載のカルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンの効果が主にAPTT延長効果が主体であったのに対し、上記遺伝子組み換えによって得られた種々のトロンビン誘導体を、さらに国際公開第02/077031号パンフレット記載のカルボキシル基修飾方法を用いて一定範囲の個数の修飾を行った誘導体は、その活性中心及びその他のアミノ酸の置換、及び変異体の配列の組み合わせに依存し、APTT延長及び抗血小板効果のバランスを選択しうる様々な特徴の抗血栓効果を有する事を見出した。さらに本発明の誘導体にカルボキシル基修飾を行うことでリストセチン惹起血小板凝集(血小板膜上のGPIb α とvWF(von-Willebrand factor)との相互作用による血小板凝集で、主に血小板粘着に関与する)抑制効果を有する事を見出した。

特に本発明の種々のアミノ酸置換型トロンビン誘導体をさらにカルボキシル基修飾することにより、非常に高いAPTT延長効果を持ち 且つ強い抗血小板効果(特にPAR1活性化及びリストセチン惹起血小板凝集抑制効果)を有する誘導体、中程度のAPTT延長効果を持ち且つ強い抗血小板効果を有する誘導体などが得られ、アミノ酸置換とカルボキシル基修飾の組み合わせにより種々の血栓症に適応しうる抗血液凝固効果、抗血小板効果を持ったトロンビン誘導体が作製できることを見出した。

本発明者はこれらの知見に基づいて本発明を完成させた。

$[0\ 0\ 1\ 4\]$

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

- (1)野生型トロンビンのアミノ酸を1個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下であるトロンビン誘導体。
- (2)トロンビン基質結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である(1)のトロンビン誘導体。
 - (3)ヒルジンC末端ペプチド結合能を有する(1)のトロンビン誘導体。
- (4)トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上である(1)の トロンビン誘導体。
- (5) ヘパリン結合能が野生型トロンビンと同程度である(1) ~ (4) の何れかのトロンビン誘導体。
- (6) 0.1 MのNaClを含むpH7.4の50mMトリス塩酸中でトロンビン基質と37℃で3時間反応させたときに分解されるトロンビン基質の割合が10%以下である(1) \sim (5) の何れかのトロンビン誘導体。
 - (7)トロンビン基質が血液凝固第13因子である(6)のトロンビン誘導体。
- (8)トロンビン基質がトロンビンレセプター細胞外ドメインのペプチドである(6)のトロンビン誘導体。
 - (9)トロンビン基質がフィブリノゲンである(6)のトロンビン誘導体。
- (10)0.1MのN a C 1 を含む p H 7 . 4 の 5 0 m M F リス塩酸に溶解した 1 m g m 1 フィブリノゲン溶液に、終濃度が0.1mg/m1になるように加えて、37 \mathbb{C} 、 3 時間 4 \mathbb{C}

キュベーションしたときにフィブリンクロットを形成させない(1) \sim (6)の何れかのトロンビン誘導体。

- (11)トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である(1) \sim (10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (12)抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である(1)~(10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (13)フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である(1)~(10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (14)抗血液凝固カスケード効果もしくは抗血小板効果、またはその両方を有し、さらにフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下である(1)~(10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (15)トロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に2倍以上に高まった(1)~(10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (16)トロンビンレセプターまたは血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に2倍以上に高まった(1)~(10)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (17)野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、(1)~(16)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (18)ヒト野生型トロンビンが配列番号2のアミノ酸配列を含む蛋白質である(17)のトロンビン誘導体。
- (19)カルボキシル基が修飾された(1)~(18)のいずれかのトロンビン誘導体
- (20) アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された(19) のトロンビン誘導体。
- (21)ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された(19)のトロンビン誘導体。
- (22) アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された(19) のトロンビン誘導体。
- (23)前記ポリエチレングリコールが分子量1000以下のポリエチレングリコールである、(21)または(22)のトロンビン誘導体。
- (24) カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された(19) のトロンビン誘導体。
- (25) 一分子当たり少なくとも3個以上のカルボキシル基が修飾された(19) \sim (24) のいずれかのトロンビン誘導体。
- (26) 一分子当たり25個以下のカルボキシル基が修飾された(29) ~ (24) のいずれかのトロンビン誘導体。
- (27)少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された(19)~(26)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (28)血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した(19)~(27)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (29)血小板のGPIb α 拮抗能を有する(19)~(27)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (30)野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも2つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。
- (31)野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸から選ばれた少なくとも1つのアミノ酸と、B鎖の205番目のセリンが置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導

体。

- (32) B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、グリシン、およびシステインのいずれかである(30)または(31)のトロンビン誘導体
- (33) B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がグリシンである(30) または(31)のトロンビン誘導体。
- (34)B鎖の205番目のセリンを置換するアミノ酸がアラニンである(30)または(31)のトロンビン誘導体。
- (35) B鎖の203番目のグリシンを置換するアミノ酸が、アラニン、スレオニン、およびセリンのいずれかである(30)または(31)のトロンビン誘導体。
- (36) B鎖の99番目のアスパラギン酸を置換するアミノ酸が、アスパラギンである(30) または(31) のトロンビン誘導体。
- (37)B鎖の43番目のヒスチジンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはアスパラギンである(30)または(31)のトロンビン誘導体。
- (38) 野生型トロンビンのアミノ酸配列において、少なくともB鎖の203番目のグリシンとB鎖の205番目のセリン置換されたトロンビンであって、該205番目のセリンがグリシンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。
- (39) B鎖の203番目のグリシンがアラニンに置換された、(38) のトロンビン誘導体。
- (40)野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリン及びB鎖の43番目のヒスチジンが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。
- (41) B鎖の205番目のセリンを置換する他のアミノ酸がグリシン、アラニン、スレオニン、システインのいずれかである、(40)のトロンビン誘導体。
- (42)野生型トロンビンのアミノ酸配列において、B鎖の205番目のセリンがアラニンに置換され、B鎖の43番目のヒスチジンがアラニンに置換されたアミノ酸配列を有するトロンビン誘導体。
- (43) さらに、ナトリウム結合部位のアミノ酸が置換された、(30) ~ (42) のいずれかのトロンビン誘導体。
- (44)ナトリウム結合部位のアミノ酸がB鎖の232番目又は234番目のアスパラギン酸である(43)のトロンビン誘導体。
- (45) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、ヒルジンC末端ペプチド結合能が野生型トロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (46)さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンビンレセプター結合能がアンヒドロトロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (47) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (48) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、トロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。
- (49) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つトロンボモジュリンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。
 - (50) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミ

ノ酸が置換、欠失、挿入又は付加され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(51) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、フィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30) ~ (44) のいずれかのトロンビン誘導体。

(52) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれか又は両方を保持し、且つフィブリノゲンとの結合能が野生型トロンビンの50%以下に低下した(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(53) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に2倍以上に高まった(30)~(44))のいずれかのトロンビン誘導体。

(54) さらに、前記置換されたアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換され、該置換によってトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に2倍以上に高まった(30)~(44)のいずれかのトロンビン誘導体。

(55) 置換されるアミノ酸がB鎖の77番目のリシンである(47) \sim (54) のいずれかのトロンビン誘導体。

(56) B鎖の77番目のリシンを置換するアミノ酸が、アラニンまたはグルタミン酸である(55)のトロンビン誘導体。

(57) 置換されるアミノ酸がB鎖の24番目のグルタミンである(47) ~ (54) のいずれかのトロンビン誘導体。

(58)野生型トロンビンがヒト野生型トロンビンである、(30)~(57)のいずれかのトロンビン誘導体。

(59)ヒト野生型トロンビンが配列番号2のアミノ酸配列を含む蛋白質である(58)のトロンビン誘導体。

(60)カルボキシル基が修飾された(30)~(59)のいずれかのトロンビン誘導体。

(61)アミノ酸のエステルによってカルボキシル基が修飾された(60)のトロンビン誘導体。

(62)ポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された(60)のトロンビン誘導体。

(63) アミノ基を有するポリエチレングリコールによってカルボキシル基が修飾された(60) のトロンビン誘導体。

(64) 前記ポリエチレングリコールが分子量1000以下のポリエチレングリコールである、(62) または(63) のトロンビン誘導体。

(65)カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾された(60)のトロンビン誘導体。

(66)一分子当たり少なくとも3個以上のカルボキシル基が修飾された請求項60~ 65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

(67) 一分子当たり25個以下のカルボキシル基が修飾された請求項60~65のいずれか一項に記載のトロンビン誘導体。

(68)少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾された(60)~(67)のいずれかのトロンビン誘導体。

(69) 血小板のリストセチン凝集抑制能が向上した(60) ~(68) のいずれかのトロンビン誘導体。

(70) 血小板のGPIb α 拮抗能を有する(60) \sim (68) のいずれかのトロンビン誘導体。

(71)(1)~(29)のいずれかのトロンビン誘導体をコードするDNA。

- $(72)(30)\sim(59)$ のいずれかのトロンビン誘導体をコードするDNA。
- (73)(1)~(70)のいずれかのトロンビン誘導体を含有する医薬組成物。
- (74)抗血栓剤である(73)の医薬組成物。
- (75)抗炎症剤である(73)の医薬組成物。
- (76)血小板凝集抑制剤である(73)の医薬組成物。
- (77)血小板粘着抑制剤である(73)の医薬組成物。
- (78) 内因系血液凝固抑制剤である(73) の医薬組成物。
- (79)トロンビンレセプター活性化抑制剤である(73)の医薬組成物。
- (80)抗血液凝固作用と抗血小板作用の両方を有する(73)の医薬組成物。

【発明の効果】

$[0\ 0\ 1\ 5]$

本発明のトロンビン誘導体は、従来の化学的手法により得られたトロンビン誘導体に比べて、より少ない使用量で安定な抗血栓効果を得ることが出来る。なぜならば、従来のAHTやM-AHTのように化学的手法により得られたものに比べ、得られるトロンビン誘導体個々のトロンビン基質分解活性やトロンビン基質結合能のばらつきが実質的に皆無であるからである。さらに、本発明のトロンビン誘導体は、AHTやM-AHTのようにトロンビンからアンヒドロ化、再生処理の多工程を経ずに高回収率で抗血栓、抗炎症作用をもった不活性化トロンビンを得ることができる。また、従来の変異体に比べても、トロンビン基質分解活性が低いため、より少ない使用量で安定な抗血栓効果を得ることが出来る。

また、活性中心及びその他のアミノ酸の置換を行うことにより、血中に多量に存在するトロンビン基質であるフィブリノゲンへの親和性を特異的に低下させることで、より低濃度で高い抗血栓効果を得ることができる。さらにアミノ酸の置換によりトロンボモジュリンとの親和性を特異的に低下させた誘導体は、生体内でのプロテイン(活性化を阻害する事が抑制し、生体内においてAhTやM-AhTと比較しより高い抗血栓効果を有する。

また、本発明のアミノ酸の置換を行ったトロンビン誘導体と国際公開第02/0770 31号パンフレットのカルボキシル基修飾の組み合わせによって、該文献記載のカルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンとは異なる種々の特徴を持った各種血栓症に最適に適応した抗血栓効果を持ったトロンビン誘導体を得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

$[0\ 0\ 1\ 6]$

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のトロンビン誘導体は、野生型トロンビンのアミノ酸を1個もしくは数個置換して得られるトロンビン誘導体であって、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの活性よりも低下した誘導体である。ここで数個とは、2~20個、好ましくは2~10個、より好ましくは2~5個を意味する。なお、本発明のトロンビン誘導体は、トロンビン基質への結合能を保持していることが好ましい。

$[0\ 0\ 1\ 7]$

ここで野生型トロンビンとしてはヒトの野生型トロンビンが好ましく、配列番号2のアミノ酸配列を含むトロンビンがより好ましい。この配列はヒト野生型トロンビンのA鎖及びB鎖を含む配列である。なお、生体内では、トロンビンは、プロトロンビン(トロンビン前駆体)がXa因子などのプロテアーゼによって切断され、A鎖(例えば配列番号2のアミノ酸番号1~49の領域)及びB鎖(例えば配列番号2のアミノ酸番号50~308の領域)がS-S結合によって架橋された立体構造を有している(血栓・止血・線溶 中外医学社 p164-167)。したがって、本発明におけるトロンビン誘導体は、生体内で前記構造をとることができるものであれば特に制限されず、A鎖及びB鎖が生体内に 力ビンだけでなく、遺伝子組換えや化学合成などで別々に作製されたA鎖とB鎖が生体内に 投与され、生体内で前記のA鎖及びB鎖がS-S結合によって架橋された立体構造をとるよう になったものも含む。ここで、ヒトトロンビンにおいてはA4銭N末端から13アミノ酸残基は 自己分解に切り離される。よっC4鎖はヒトトロンビンにおいてはN末端から13アミノ酸残基

が切り離された配列でも良い。さらに、生体内で前記の立体構造をとることのできるプロトロンビンやプレトロンビンなどのトロンビン前駆体蛋白質も本発明のトロンビン誘導体に含まれる。

[0018]

本発明において、「トロンビン基質への結合能」とは、血液凝固第8因子やトロンビンレセプターなどのトロンビン基質やその一部のペプチドに対する結合能を意味する。トロンビン基質としては血液凝固第8因子及びトロンビンレセプターが血栓形成及び炎症作用の進行に非常に重要であり、実質的には血液凝固第8因子及びトロンビンレセプターのトロンビンによる活性化を抑制することで血栓形成及び炎症作用は充分抑制される。したがって、トロンビン基質としては血液凝固第8因子あるいはトロンビンレセプターのトロンビン結合領域を含むペプチドが好ましい。

本発明において、抗血栓作用とは、好ましくは、抗血小板、抗血液凝固の1次止血、2次止血を合わせた全体での抗血栓作用を意味する。本発明の抗血小板作用、及び抗血液凝固作用を有するトロンビン誘導体は、例えば、1次止血においては主にGP1b α (血小板受容体糖タンパク質1b α) 及びトロンビンレセプターに作用することで血小板へのカルボキシル基修飾トロンビン、リストセチン及びずり応力等の刺激を抑制して血小板凝集及び粘着を抑制し、2次止血においては主に血液凝固第8因子の活性化を抑制してAPTT(部分活性化トロンボプラスチン時間)を特異的に延長する。

本発明では、抗血小板効果確認の中でカルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制 効果を用いて評価している。

カルボキシル基修飾トロンビンがPRP(多血小板血漿:platelet rich plasma)中において血小板凝集を惹起すること、及びその血小板凝集惹起は抗PARI抗体(ATAP2 コスモバイオ社)によって完全に阻害されることから、カルボキシル基修飾トロンビンはPARIを介して血小板を活性化すると考えられる。したがって、本発明で得られる誘導体のカルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集を阻害する効果はPARI活性化阻害効果に基づくと考えられる。

$[0\ 0\ 1\ 9]$

また、「トロンビン基質への結合能」は、トロンビン基質に保存されている領域のアミ ノ酸配列を有するペプチド、又はトロンビン基質結合に重要と報告されているサイトに特 異的に結合するペプチド、具体的には、ヒルジン(末端ペプチドなどに対する結合量を測 定することによってスクリーニングしてもよい。トロンビンのエクソサイト]は多くの血 栓形成、炎症作用を持ったトロンビン基質蛋白質への結合に最も重要な役割を果たす必須 の領域として報告されている領域であるが(Journal of Biological Chemistry 1989Vol 264 8692-8698)、ヒルジン(末端ペプチドはこのエクソサイト|に対し特異的に結合する ことが知られる(Journal of Biological Chemistry 1991 Vol 266 23633-23636)。特に 、血小板活性化を通じて血栓形成に重要な働きを持つトロンビンレセプターはヒルジン() 末端領域に高い相同性を持ち、エクソサイト|へ強固に結合する事が報告されている。よ ってヒルジン〔末端ペプチドに対する結合能を失っているものはエクソサイト」の構造が破 壊されトロンビンレセプターをはじめとする多くのトロンビン基質への結合能を失ってい るものと考えられる。ヒルジン(末端ペプチド(例えば、配列番号3)に対する結合能は 、実施例に示すようにヒルジンカラムへのトロンビン誘導体の結合量を測定することによ って行うことができる。本発明のトロンビン誘導体は、野生型トロンビン又はアンヒドロ トロンビンの1%以上、好ましくは10%以上、より好ましくは80%以上のトロンビン 基質結合能を保持していることが望ましい。ここで、アンヒドロトロンビンはトロンビン の活性中心セリンが脱水酸化されたトロンビンであって、具体的には、国際公開第01/ 03740号バンフレットの実施例1記載のアンヒドロトロンビンを例示することができ る。

[0020]

一方、本発明のトロンビン誘導体は、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの活性よりも低下していることが好ましいが、この「トロンビン基質分解活性」は、フィブリ

ノゲン、血液凝固第13因子、トロンビンレセプターなどの生体基質やS2238(シグマ社より入手可)などの合成基質を用いて測定することができる。ただしトロンビン誘導体を化学修飾などにより本来トロンビンの持つ基質特異性を変化させている場合、トロンビン誘導体が特異性を残している基質を選択する必要がある。但しトロンビン誘導体と蛋白質基質のKmより明らかに基質が高濃度で測定される場合には活性測定に基質特異性は影響は無いと考えられる。また、フィブリノゲン凝固活性を確認することによっても「トロンビン基質分解活性」を測定することが出来る。

[0021]

本発明のトロンビン誘導体の活性は、野生型トロンビンに比べてより一層低下したレベルである事が望ましい。具体的には100万分の1以下、さらに望ましくは1000万分の1以下に低下していることが望ましい。トロンビンの生理的条件下における蛋白質基質活性化におけるkcat値は約 $100sec^{-1}$ レベルにもなり、他多くの基質に対しても同等のkcat値を示す。ラット投与実験におけるアンヒドロトロンビン生体内薬効半減期は1時間以内であり、ヒトにおいても同等以上が予測され、1000万分の1以下であれば抗血栓、抗炎症効果を目的としてトロンビン誘導体を投与した際、数時間にわたって蛋白性のトロンビン基質と結合した場合にもトロンビン誘導体のトロンビン基質分解活性が問題となることがないと考えられる。

[0022]

ただし、実際には合成基質による活性測定は種々のプロテアーゼの影響を大きく受け、 100万分の1のレベルの活性を正確に測定する事は難しく、正確な基質分解活性は、より好ましくはトロンビンの蛋白質基質に対する分解活性を測定した方がより微妙な分解活性を確認する事ができる。

より具体的には、本発明のトロンビン誘導体は、例えば、実施例で示すような生理的条件下、3時間、フィブリノゲン、血液凝固第13因子、トロンビンレセプター、プロテイン (などのトロンビン基質と混合し反応させた場合の該基質の分解が10%以下のものを挙げることができる。上記条件であれば生体への投与後、本誘導体が代謝されるまでの間の本誘導体によるトロンビン基質活性化は問題にならないと考えられる。なお、この活性測定方法を用いると、Biochimica et Biophyscia Acta 1451(1999) 173-186において完全に活性を失っていると報告されているB鎖 203 番目 グリシンをアラニンに置換した誘導体は基質蛋白質分解活性を明らかに有する等、本発明記載の抗血栓剤として用いるのに必要なレベルの活性低下のスクリーニングが可能となる。

本発明で得られるトロンビン誘導体は特表平09-509045、J. Biol. Chem Vol. 275, 39827-39830, J. Biol. Chem Vol. 279, 26387-26394, J. Biol. Chem Vol. 277, 27581-27584, に開示されるトロンビン誘導体とは異なる抗血栓作用の機構を有する。

すなわち、これらの文献に開示されるトロンビン誘導体はトロンボモジュリン特異性が保持又は向上しており、優先的にプロテイン(を活性化する事で抗血栓性を発揮する。これに対し、本発明のトロンビン誘導体はプロテイン(を含むトロンビン基質の活性化能を有さない。また反対にトロンボモジュリン親和性もより低下している事が望ましい。本発明のトロンビン誘導体は、より特異的に、血栓形成に重要なトロンビン基質に対し、活性化すること無しに結合し、血液中に存在するトロンビンによるこれらトロンビン基質の活性化を抑制することによって抗血栓性を発揮する。反対に本発明のトロンビン誘導体は生体内のトロンビンのトロンボモジュリン結合を阻害しないことが望ましく、トロンボモジュリン親和性は低下している事が望ましい。

$[0\ 0\ 2\ 3\]$

本発明のトロンビン誘導体は、通常の遺伝子変異導入法によってトロンビンの変異体をコードするDNAを作製し、該DNAを哺乳動物細胞などで発現させることによって得られる変異体の中から基質分解活性が低下し、かつ、ヒルジン及びトロンビン基質に対する結合能を保持しているものを選択することによって第一段階のスクリーニングをすることができる。

[0024]

本発明の1個又は数個のアミノ酸を置換して得られるトロンビン誘導体は、抗血栓、抗 炎症剤として用いる目的において、実質的にトロンビン基質分解活性を喪失しており、且 つ基質結合能を野生型トロンビンと同等に保持していれば特に制限されるものではないが 、具体的には、B鎖の205番目のセリン(B鎖205;配列番号2の254番目のセリ ンに相当するセリン)、203番目のゲリシン(B鎖203;配列番号2の252番目の グリシンに相当するグリシン)、43番目のヒスチジン(B鎖43;配列番号2の925 目のヒスチジンに相当するヒスチジン)、および99番目のアスバラギン酸(B鎖999; 配列番号2の148番目のアスバラギン酸に相当するアスバラギン酸(B りの203番目の が近上のアミノ酸が置換されたトロンビン誘導体であることが好ましく、B鎖の203番目の のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスバラギン酸から選ばれた2つ 以上のアミノ酸と、B鎖の203番目のゲリシン、43番目のヒスチジンのいず れか一方または両方のアミノ酸と、B鎖の205番目のセリンが置換されたアミノ酸配列 を有するトロンビン誘導体が特に好ましい。

[0025]

活性中心であるB鎖205番目のセリンは、その置換によってエクソサイト | の構造が破壊されてトロンビン基質結合能が損なわないようにするために、スレオニン、アラニン、グリシン、システインのいずれかに置換されていることが好ましく、アラニン、グリシンへの置換がより好ましい。B鎖203グリシンは、アラニン、セリン、スレオニンのいずれかに置換されている事が好ましい。B鎖99のアスバラギン酸は、アスバラギンに置換されていることが好ましい。B鎖43のヒスチジンは、アラニンまたはセリンまたはアスバラギンに置換されていることが好ましい。

[0026]

なお、本明細書中において、B鎖205、B鎖203等は、B鎖の1番目のアミノ酸(例えば、配列番号2のアミノ酸番号50のイソロイシン)から数えたアミノ酸番号を示している。なお、上記のような置換アミノ酸の位置はアミノ酸の欠失、挿入、付加などによって位置が前後することがある。例えば、N末端部に1つのアミノ酸残基が挿入されれば本来205番目のセリン残基は206番目となるが、そのような205番目のセリン残基に相当するセリン残基も、本発明においては205番目のセリン残基と呼ぶこととする。

[0027]

以下にアミノ酸の置換とそれによって得られる誘導体について説明する。 本発明のトロンビン誘導体は1)のステップ及び2)、3)の付加的ステップによって得られる。

- 1)活性中心のアミノ酸の置換によって活性を喪失させ、且つ、エクソサイト | 及び | 1等の重要部位の構造が保存された配列を選択し、好ましくはその中でも抗血栓効果の高い活性中心のアミノ酸置換の組み合わせを選択するステップ、
- 2)活性中心以外のアミノ酸の置換によって1)で得られた基本となる誘導体の基質特異性を変化させ、1)の誘導体より高い抗血栓効果、トロンボモジュリンへの親和性の特異的な低下 等の特徴を付加させるステップ、
- 3) 1) または2) のトロンビン誘導体のカルボキシル基を修飾することで、さらに高い抗血栓作用を有する誘導体、抗血栓作用の中でも内因系凝固、トロンビンレセプターの活性化による血小板凝集、リストセチン惹起血小板凝集(血小板粘着)に対し種々の強さで抑制しうる誘導体を作製するステップ。

以下、アミノ酸の置換の影響、意味合いを理解しやすくする為、活性中心のアミノ酸の 置換、活性中心以外のアミノ酸の置換に分けて説明する。

[0028]

活性中心アミノ酸の置換について

B鎖の205番目のセリン、203番目のグリシン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸のうち、置換される2つ以上のアミノ酸の組合せは特に制限されるものではないが、置換を受ける2つ以上のアミノ酸(置換部位)の組合せ、さらには、

置換相手となるアミノ酸の種類により、基質結合能や抗血栓効果に違いが出ることがある。一例として、下記トロンビン誘導体1~5を挙げて説明する。

[0029]

トロンビン誘導体1: 置換部位がB鎖205番目のセリンと99番目のアスパラギン酸であり、セリンをアラニンに置換し、アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン誘導体(配列番号22のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体2:置換部位がB鎖205番目のセリンと43番目のヒスチジンであり、セリンをアラニンに置換し、ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン誘導体(配列番号26のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体3: 置換部位がB鎖205番目のセリンと203番目のグリシンであり、セリンをグリシンに置換し、グリシンをアラニンに置換したトロンビン誘導体(配列番号8のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体4:置換部位がB鎖205番目のセリンと203番目のグリシンであり、セリンおよびグリシンをアラニンに置換したトロンビン誘導体(配列番号24のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体5:置換部位がB鎖205番目のセリン、203番目のグリシン、および99番目のアスパラギン酸であり、セリンおよびグリシンをアラニンに置換し、アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン誘導体(配列番号14のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体6: 置換部位がB鎖205番目のセリン、43番目のヒスチジンであり、セリンをグリシンに置換し、ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン誘導体(配列番号34のアミノ酸番号44~351の配列)。

トロンビン誘導体7:置換部位がB鎖205番目のセリン、43番目のヒスチジンであり、セリンをアラニンに置換し、ヒスチジンをセリンに置換したトロンビン誘導体(配列番号36のアミノ酸番号44~351の配列)。

[0030]

トロンビン誘導体1~5は何れも、ヒルジンゲルへの結合能を保持していたが、トロンビン誘導体4および5は、野生型トロンビンに比べ、ヘバリンゲルへの結合能が低下していた。

[0031]

トロンビン誘導体 1 ~ 5 は何れもAPTT延長を主とした抗血栓効果を有するものであるが、その効果の序列は下記の通りであった。

「トロンビン誘導体2>トロンビン誘導体1、3>>トロンビン誘導体4、5」特に、トロンビン誘導体2は、後述のようなカルボキシル基修飾の有無に関わらず非常に高い抗血栓効果がみられた。また、トロンビン誘導体2にみられる抗血栓効果は、凝固カスケードに対し特異的に作用するものであり、特にAPTTを良く延長した。さらに、トロンビン誘導体2のカルボキシル基を修飾したトロンビン誘導体における抗血栓効果は、いずれも強い、凝固カスケード、血小板凝集、および血小板粘着抑制作用によってもたらされるものであった。

トロンビン誘導体2および4は、共に205番目のセリンをアラニンに置換したものであるが、前述のようにその抗血栓効果には大きな違いが見られた。トロンビン誘導体3および4も、共に203番目のグリシンをアラニンに置換したものであるが、やはりその抗血栓作用には前述のような違いが見られた。

トロンビン誘導体1,3はそのままではそれほど強い抗血栓性は有さないが、後述のような化学修飾によって基質特異性を変化させるか、又はアミノ酸(例えばB鎖77番目のリシン)を置換しフィブリノゲンへの親和性を特異的に低下させ、相対的に血液凝固第8因子に対する特異性を向上させる事によって、強いAPTT延長抑制効果又は血小板凝集抑制効果の一方又は両方を有するトロンビン誘導体が得られる。具体的には、化学修飾の場合はAPTT延長と抗血小板効果(凝集と粘着)が得られ、77番目のアミノ酸置換の場合はAPTT延長効果のみが得られる。

一方、トロンビン誘導体4,5においてはカルボキシル基の化学修飾を行った場合でも、また77番目のリシンを置換し遺伝子工学的に特異性を変化させてもあまり強い抗血栓能は得られなかった。

誘導体6,7は誘導体2同様に近い抗血栓能を示した。

[0032]

以上より、トロンビン活性中心の置換によって得られるトロンビン誘導体は、以下の様に分類される。ただし、以下の分類はあくまでも一例であり、本発明のトロンビン誘導体はこの外の分類に分類されるトロンビン誘導体であってもよい。

- A)活性中心セリン及び活性中心ヒスチジンを同時に置換することによって得られる、カルボキシル基修飾及びフィブリノゲンへの親和性を低下させる分子表面のアミノ酸の置換無しで強いAPTT延長効果を主とした抗血栓能を有するタイプ。
- B)活性中心セリン及び活性に関与する他のアミノ酸1つを同時に置換することによって得られるトロンビン誘導体であり、そのままではそれほど強い抗血栓能を持たないが、カルボキシル基修飾及び/又はフィブリノゲン親和性を低下させるさらなるアミノ酸の置換によって高い抗血栓能が現われるタイプ。
- () 活性中心セリンのみ/又は活性に関与する他のアミノ酸1つを同時に置換することによって得られるトロンビン誘導体でありカルボキシル基修飾及び/又はフィブリノゲン親和性を低下させるアミノ酸の置換によっても高い抗血栓能は現われないタイプ。
- D) 抗血栓能を有しているものも残存活性を有しているため、抗血栓剤としては使用できないタイプ。
- A)のグループに関してフィブリノゲン、血液凝固第8因子(FVIII)に対する基質特異性を確認したところ、活性中心のセリン、ヒスチジンを置換したグループはいずれも血液凝固第8因子特異性が向上していることが分かった。よって高いAPTT延長効果は活性中心のアミノ酸の置換の組み合わせによって基質分解活性が喪失されるとともに血液凝固第8因子特異性が向上(フィブリノゲン特異性が低下)したことに起因すると考えられる。本グループの誘導体は化学修飾無しに、そのフィブリノゲン親和性の低下により弱い抗血小板効果も確認された。また、その効果はPARI活性化抑制効果であり、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果は有さない特徴を有していた。

[0033]

トロンビンの立体構造を勘案すると活性中心と、ヒルジン(末端ペプチド、ヘバリンのそれぞれの結合部位であるエクソサイト|及び||は立体構造上距離が離れている。即ち、上記で例示された活性中心の置換の組み合わせにより、ヘバリン親和性が低下したグループ及び実施例で記載されている活性中心のアミノ酸の置換によってヒルジン(末端ペプチドゲルへの親和性が低下した誘導体は、活性中心のアミノ酸の無理な(構造上負荷のかかる)置換によって分子全体のフォールディング異常、構造に異常が起こったと考えられる。その為、基質親和性の低下が起こり抗血栓能の低下が起こったと推測される。

[0034]

上記記載の活性中心の置換で基質親和性を有し抗血栓能を有した配列(構造の正常な配列)に対しさらに抗血栓能を向上させる目的でエクソサイト「及び」「領域上のアミノ酸のさらなる置換を組み合わせた誘導体の説明を以下に行う。このさらなるアミノ酸の置換によってヘバリン、ヒルジンゲルへの親和性が低下する場合も存在するが、これは結合領域への直接的なアミノ酸の変異の結果であり、活性中心のアミノ酸の置換での蛋白全体の構造異常に基づく親和性の低下とは異なるものである。

[0035]

活性中心以外のアミノ酸の置換を述べる。

本発明のトロンビン誘導体は、上記置換に加えて、活性中心に関与するアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸のさらなる置換によってトロンボモジュリン及び/またはフィブリノゲンへの結合能を特異的に低下した誘導体であることが好ましい。ここで、活性中心のアミノ酸としては、B鎖の205番目のセリン、43番目のヒスチジン、および99番目のアスパラギン酸などが挙げられる。このような誘導体のトロンボモ

ジュリン及び/またはフィブリノゲン結合能は野生型トロンビンの50%以下に低下していることが好ましい。トロンボモジュリン結合能を選択的に低下させることで、本発明のトロンビン誘導体が生体内に投与された場合にトロンボモジュリンに結合し、本来生体内で機能するべきトロンビンのプロテイン(活性化を抑制することを防ぐことができる。このようなトロンビン誘導体は、少なくとも抗血液凝固カスケード又は抗血小板効果のいずれかを保持するものが好ましい。

トロンビンは、生体内ではトロンビンレセプター、血液凝固第8因子、トロンボモジュリン及びフィブリノゲンなどへの結合能を有しているが、上記トロンビン誘導体は、トロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がフィブリノゲンへの結合能に比較して相対的に高まる事で抗血栓効果が有意に高まったトロンビン誘導体、またはトロンビンレセプター又は血液凝固第8因子への結合能がトロンボモジュリンへの結合能に比較し相対的に高まったトロンビン誘導体であることが好ましい。なお、「相対的に高まった」とは、例えば、アミノ酸の置換により、置換前に比較し、誘導体の、トロンビンレセプター又は血液凝固第8因子に対する結合定数、又はIAsys等での結合容量と、トロンボモジュリンやフィブリノゲンに対する結合定数もしくは結合量の比が高まったことをいう。

[0036]

トロンボモジュリン及び/またはフィブリノゲンへの結合能を特異的に低下させる置換は特に限定されるものではないが、B鎖77番目のリシン(B鎖77;配列番号2の126番目のリシンに相当するリシン)又はB鎖24番目のグルタミン(B鎖24;配列番号2の73番目のグルタミン)、B鎖65番目のリシン(配列番号2の114番目のリシンに相当するリシン)等があげられる。B鎖77リシン及びB鎖24グルタミン、B鎖65リシンを置換するアミノ酸は特に限定されるものではないが、アラニン、セリン、スレオニン、グルタミン酸またはグルタミンであることが好ましい。

以下に例をあげると、活性中心 203 グリシンをアラニンに活性中心 205 セリンを グリシンに置換したトロンビンは殆どAPTT延長効果を示さなかった。しかしながら、さらに本誘導体に B鎖 77 リシンの グルタミン酸への置換を組み合わせた誘導体(配列番号 28 のアミノ酸番号 44 ~ 351 の配列)は、血液凝固第 8 因子特異性がフィブリノゲン特異性に対し相対的に向上し且つ高い APTT延長効果を有した。

また、活性中心セリンをアラニンに、かつ活性中心ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビンは高いAPTT延長効果を示した。この誘導体にさらに、B鎖77リシンのグルタミン酸又はアラニンへの置換を導入することでさらに、さらに強いAPTT延長抑制効果を有した(配列番号38または44のアミノ酸番号44~351の配列)。すなわち活性中心の置換による特異性の変化とさらに分子表面のアミノ酸置換による特異性の変化が相乗効果となって薬効の強さに影響する事がわかる。

また、活性中心セリンをアラニンに、かつヒスチジンをアラニンに置換し、さらにB鎖 24 番目のグルタミンをグルタミン酸に置換した誘導体(配列番号 40 のアミノ酸番号 $4\sim351$ の配列)は、APTT延長効果を有し且つ、TM(トロンボモジュリン)結合能が著しく低下していた。

活性中心セリンをアラニンに、かつヒスチジンをアラニンに置換し、さらにB鎖65番目のリシンをアラニンに置換した誘導体(配列番号46のアミノ酸番号44~351の配列)は、APTT延長効果が増幅し、更にトロンボモジュリン親和性が低下するという2重の効果がみられた。

このように活性中心のアミノ酸の置換に加えてトロンビン分子表面の各蛋白質への相互作用部位を置換することで種々の特徴を有したトロンビン誘導体が得られる。

本発明で得られるトロンビン誘導体はプロトロンビン体にて生体内に投与されることも可能である。その場合、血栓部位にて抗血栓効果を持ったトロンビンに活性化を受け、血栓形成箇所にて抗血栓効果を発揮し、生体内にてより部位特異的な抗血栓効果が得られる。

[0037]

本発明のトロンビン誘導体は、上記置換に加えて、さらに、ナトリウム結合部位が置換されたトロンビン誘導体であってもよい。ナトリウム結合部位とはBiochemistry 1992年,

31巻,p11721-11730に開示された部位をいう。この中ではB鎖232又はB鎖234のアスパラギン酸(配列番号2の281又は283番目のアスパラギン酸に相当するアスパラギン酸)が好ましい。これらのアスパラギン酸は両方が置換されてもよい。また、これらのアスパラギン酸は、アラニンもしくはアスパラギンに置換されることが好ましい。

[0038]

本発明のトロンビン誘導体は、ヒルジンC末端ペプチドへの結合能が野生型トロンビンの1%以上であり、トロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である限りにおいて、上述した置換されるアミノ酸以外のアミノ酸において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されたアミノ酸配列を有する誘導体であってもよい。なお、ここで数個とは、2~20個、好ましくは2~10個、より好ましくは2~5個を意味する。また、ヒルジンC末端ペプチドへの結合能が野生型トロンビンの1%以上、かつトロンビン基質分解活性が野生型トロンビンの100万分の1以下である限りにおいて、配列番号2のアミノ酸配列と全体として一定以上の相同性、すなわち、80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有する範囲で改変されたものであってもよい。

[0039]

上記のようなトロンビン誘導体は部位特異的変異導入法により各誘導体をコードするDNAを作製し、該DNAを哺乳動物細胞などで発現させることによって得られる。このようなDNAは上述したようにA鎖及びB鎖の両方をコードするものであってもよいし、各鎖をそれぞれ発現させてもよい。部位特異的変異導入法は特に限定されるものではないが、例えば、市販のQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社製)などを用いて行っても良い。また、化学合成によってトロンビン誘導体を得ることもできる。

[0040]

本発明のトロンビンはさらに、上記の誘導体のカルボキシル基が修飾されたものであってもよい。この場合、カルボキシル基がカルボジイミドによって修飾されたものが好ましい。カルボキシル基が修飾されることによって、フィブリノゲンに対する結合能が低下するため、トロンビンレセプターなどの基質に対する選択性が増し、より少量で抗血栓効果を達成することができる。

さらに上記カルボキシル基修飾によりリストセチン惹起血小板凝集(GPIb α と v WFの相互作用による)を抑制する効果が加わる。

トロンビン誘導体のカルボキシル基の修飾は、例えば、国際公開02/077031号パンフレットに記載の方法に基いて行うことができる。

$[0\ 0\ 4\ 1]$

また、上記誘導体をアミノ基を有する化合物を用いてカルボキシル基修飾してもよい。アミノ基を有する化合物は特に制限されないが、アミノ酸のエステル、側鎖にアミノ基を有するポリエチレングリコールなどが好ましい。アミノ酸のエステルとしてはグリシンエチルエステルなどが挙げられる。アミノ基を有する化合物を用いる修飾も国際公開 0 2 / 0 7 7 0 3 1 号パンフレットに記載の方法に基いて行うことができる。一方、上記誘導体をポリエチレングリコールと反応させることによって、カルボキシル基を修飾してもよい。なお、ポリエチレングリコールまたはアミノ基を有するポリエチレングリコールを用いる場合、ポリエチレングリコール部分の分子量は 1 0 0 0 以下であることが好ましい。

[0042]

抗血栓効果を特異的に上げるためにトロンビン表面のアミノ酸の置換を行った場合に得られる効果、及びさらにカルボキシル基修飾を組合わせた場合に得られる効果は、置換するアミノ酸の組み合わせなどによって大きく異なり、疾患及び病態などに応じて、また目的に応じてアミノ酸置換のみを導入したトロンビン誘導体または化学修飾を組み合わせたトロンビン誘導体を用いることができる。

即ち、深部静脈血栓症等の静脈における血栓症においては血液凝固を抑制する薬が一般に用いられるため、各トロンビン誘導体及びそのカルボキシル基修飾体の中から高いAPTT 延長効果を持つトロンビン誘導体を用いることが望ましい。

一方、心筋梗塞、不安定狭心症等の動脈系の血栓症においては血小板凝集を抑制する薬が一般に用いられるため、高い血小板凝集抑制効果を持ったトロンビン誘導体が望まれる。その中よりAPTT延長効果の異なるトロンビン誘導体は出血など副作用の状況等に応じて選択がなされるべきである。

また、動脈硬化部位におけるプラークの破錠にともなう、血栓症においては血小板と共に凝固系の抑制も重要であることが報告されており(血栓症、南江堂)血小板、凝固双方の抑制が効果的である。このような凝固、血小板両方に作用する薬剤は現在市販されておらず、本発明により全く新たな治療剤を提供しうる。

[0043]

以下にトロンビン誘導体の活性中心のアミノ酸置換とそのカルボキシル基修飾との関係について一例を挙げて説明する。以下の説明は水溶性カルボジイミドを縮合剤として用い、且つ修飾をグリシンエチルエステルによって行い約15個のカルボキシル基が修飾された誘導体である。

修飾体1:B鎖205セリンをアラニンに、かつB鎖43ヒスチジンをアラニンに置換した誘導体は、カルボキシル基の修飾を行わずとも、非常に高いAPTT延長効果を有している。本配列のトロンビン誘導体はカルボキシル基修飾を行った場合APTT延長効果の増幅もある程度之られるが、それ以上にカルボキシル基修飾を行った本配列のトロンビン誘導体は血小板に対するリストセチン凝集抑制効果、カルボキシル基修飾トロンビン(Mートロンビン)凝集抑制効果が大きく高まり、結果、抗血液凝固、抗血小板能共に非常に高い効果をもった誘導体が得られた。

修飾体2:B鎖205セリンをグリシンに、B鎖203番目のグリシンをアラニンに置換した誘導体は、化学修飾前には APTT延長効果、抗血小板効果は弱いものであるが、カルボキシル基修飾を行うことで、APTT延長効果、抗血栓効果が高まり中程度のAPTT抑制効果と高い抗血小板効果を持ち合わせたトロンビン誘導体が得られた。

修飾体3:B鎖205セリンをアラニンに、B鎖203番目のグリシンをアラニンに置換したトロンビン誘導体はAPTT延長効果をほとんど示さなかった。このトロンビン誘導体のカルボキシル基を修飾した場合にもAPTT延長効果の増幅は顕著には見られなかった。

修飾体4:B鎖205セリンをグリシンに、B鎖203グリシンをアラニンに、B鎖77リシンをグルタミン酸に置換したトロンビン誘導体はAPTT延長効果を持つが、抗血小板効果は非常に弱いものである。このトロンビン誘導体のカルボキシル基修飾を行った場合にはAPTT延長効果のさらなる増加は殆ど見られないが、抗血小板効果は顕著に増幅された。但し修飾による回収率は50%以下であり著しく低下した。

修飾体5:205セリンをアラニンに置換した誘導体は比較的弱いAPTT延長効果を持つが抗血小板効果は非常に弱いものであった。このトロンビン誘導体にカルボキシル基修飾を行った場合にはAPTT延長効果の大幅な増幅は見られないが、抗血小板効果は(PARI及びリストセチン両方の経路に対し)顕著に増幅された。

修飾体 6:B鎖 2:0:5 セリンをアラニンに、B鎖 4:3 ヒスチジンをアラニンに、B鎖 6:5 リシンをアラニンに置換した誘導体は強いAPTT延長効果と共に強いPAR1経路の血小板凝集抑制効果を有していた。一方、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果は有していなかった。このトロンビン誘導体にカルボキシル基修飾を行った場合はAPTT延長効果が若干増強し、M-トロンビン惹起血小板凝集効果にはそれほど大きな違いは確認されなかったが、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果が新たに付与された。また、修飾体 4 にみられた回収率の大きな低下はおきなかった。

$[0 \ 0 \ 4 \ 4]$

即ち前述の第一段階での遺伝子工学的に得られるトロンビン誘導体の中から、A)活性中心におけるアミノ酸の置換の組み合わせにより抗血栓性の増したタイプ、B) さらなるアミノ酸の置換により、フィブリノゲンへの親和性を低下させて基質特異性を変化することによって抗血栓性が増したタイプ、C) さらなるアミノ酸の置換によってA) B) C) のトロンビン誘導体のトロンボモジュリン親和性が低下したタイプ、C) C0 るC1 をれぞれのトロンビン誘導体のカルボキシル基を修飾する事で最終的にC1 を C2 が C3 に C4 に C5 に C6 に C6 に C7 に C9 に C9 に C9 に C1 に C1 に C1 に C1 に C9 に C

り応力惹起血小板凝集)効果が種々のバランスで組み合わさった種々の抗血栓効果を持ったタイプのトロンビン誘導体を選択することができる。

また、 $GP1b\alpha$ のみ抑制する誘導体の場合は活性中心が閉塞する事によって活性及び基質親和性が低下したPPACK-トロンビン(Phe-Pro-Arg配列がクロロメチルケトン修飾されたもの)を修飾した誘導体を用いることが出来る。但しその場合も本明細書記載のトロンボモジュリンに対し親和性を低下させる置換を分子表面に施すことによりより有効な効果を発揮する。

[0045]

本発明の各種トロンビン誘導体は、目的によって使い分ける事が可能である。例えば、トロンビン誘導体2は静脈内におけるフィブリン血栓(赤色血栓)に対し効果的である事が予測され、トロンビン誘導体2のカルボキシル基修飾体は、動脈内の血小板血栓(白色血栓)に対しても効果的である事が予想される。

あるいは化学修飾を行わない前述の活性中心セリンがアラニンに、活性中心ヒスチジンがアラニンに、かつB鎖77リシンがグルタミン酸に置換されたトロンビンも静脈内血栓に関しては有効と考えられる。

又、動脈内での血小板血栓においてもその疾患において出血が問題になる場合には、トロンビン誘導体2のカルボキシル基修飾体よりもAPTT延長効果の低いトロンビン誘導体3のカルボキシル基修飾体の方が望ましい。これらは疾患の患者に対するリスクと出血のリスクを考慮して選択することができる。

上記に記載されるヘバリン結合能の低下に関して、そのヘバリン結合能の低下がヘバリン結合領域(エクソサイト日等)以外の領域、例えば活性中心のアミノ酸の置換によって引き起こされる場合、その置換によってトロンビン変異体全体の分子構造に歪む等の悪影響が与えられ、ヘバリン結合能が低下したと推察される。

実際に生体内に投与する場合、活性中心を本発明で開示されるような最適な組み合わせで変異させた上で、目的に応じ、さらなる組換え体として積極的にエクソサイトIIに位置するアミノ酸(例えばB鎖98番目のアルギニン、B鎖245番目アルギニン、B鎖248番目リジンをアラニン等の他のアミノ酸)に置換する事によってヘバリン親和性を低下させたトロンビン誘導体を得ることも可能である。ヘバリン親和性を低下させた誘導体を用いることで血管内皮細胞上のヘバラン硫酸等への親和性が低下し血中循環量の向上が期待される。

[0046]

なお、カルボキシル基修飾を行う場合、カルボキシル基修飾によって付加される効果は その修飾個数によっても大きく影響を受ける。

トロンビンのカルボキシル基修飾による上記各誘導体が修飾体1から5に記載される所望の効果を得るためには3個以上のカルボキシル基が修飾される事が望ましい。3個以下では前記カルボキシル基修飾によって付加される効果は著しく低下する。同様にカルボキシル基修飾は25個以下であることが望ましい。25個を超えた場合にも前記カルボキシル基修飾による効果は著しく低下すると共に 修飾による回収率の著しい低下が起こる。但しトロンビン誘導体表面にアミノ酸置換によってカルボキシル基を導入、削除して得られるトロンビン誘導体に関しては、その置換によるカルボキシル基の増加、減少は除いて考える。

さらに修飾個数によって多様な効果を持った誘導体が得られる。例えば前述の修飾体1)の修飾個数を8又は5個と減らす事で非常に高いAPTT延長効果と中から低度の抗血小板効果を持った誘導体が得られる。

カルボキシル基を修飾する場合、少なくともB鎖25番目のグルタミン酸のカルボキシル基が修飾されたものであることが好ましい。本発明のカルボキシル基が修飾されたトロンビン誘導体は、血小板のリストセチン凝集抑制能が向上された誘導体及び/または血小板のGPIbα拮抗能を有する誘導体であることが好ましい。

$[0\ 0\ 4\ 7]$

本発明はまた、上述したようなトロンビン誘導体をコードするDNAを提供する。この

ようなDNAとしては、例えば、配列番号 7、13、21、23、25、27、33、35、37 または39の塩基番号 130~1056 の塩基配列を含むDNAなどを例示することができる。また、上述したようなトロンビン誘導体をコードする限りにおいて、配列番号 7 の塩基番号 130~1056 の塩基配列を含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものであってもよい。ここで、ストリンジェントな条件としては、例えば、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60 $\mathbb C$ 、 $1\times SSC$ 0.1%SDS S、好ましくは $0.1\times SSC$ 0.1%SDS に相当する塩濃度で、1 回より好ましくは2 ~ 3 回洗浄する条件が挙げられる。

[0048]

本発明のトロンビン誘導体は抗血栓作用を有している。この作用は、例えば、実施例に示すような血漿の部分活性化トロンボプラスチン時間(APTT)測定や全血凝固時間測定、血小板凝集能抑制効果によって確認することができる。

本発明のトロンビン誘導体を製剤学的に許容される製剤担体と組合わせることにより、医薬組成物として使用することができる。ここで、医薬組成物として好ましくは、抗血栓治療薬、抗炎症剤、血小板凝集抑制剤、血小板粘着抑制剤、血小板GPIb拮抗剤、トロンビンレセプター活性化抑制剤などを挙げることができる。上記製剤担体は製剤学的に許容されるものであれば特に制限されないが、通常の薬剤に汎用される注射剤用溶剤、安定剤、希釈剤、界面活性剤等を使用できる。本発明の医薬組成物の投与単位形態は特に限定されず、治療目的に応じて適宜選択できる。例えば、注射剤等を例示できる。本発明の医薬組成物の投与量は、症状などに応じて適宜選択される。

【実施例】

[0049]

以下実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はその趣旨を超えない限り、この実施例の範囲には限定されない。以下、血液凝固第8因子は、単にFVIIIと呼ぶこともある。また、血液凝固第13因子は、単にFXIIIと呼ぶこともある。

[0050]

< 1 >トロンビン基質分解活性の測定

方法A:合成基質S2238(シグマ社)を基質とし、50mMトリス塩酸(pH8)、37℃における405nmの吸光度の増加による測定を行った。

被験サンプル(ヒト野生型トロンビンまたはトロンビン誘導体)の $50\,\mathrm{mM}$ トリス塩酸 $0.1\,\mathrm{M}$ NaCl溶液(pH7.4)、ヒト野生型トロンビンの場合の濃度は $1\,\mu$ g/ml、トロンビン誘導体の場合の濃度は $200\,\mu$ g/ml)と、合成基質 $S2238050\,\mathrm{mM}$ トリス塩酸 $0.1\,\mathrm{M}$ NaCl溶液(pH7.4)を、 $200\,\mu$ l ずつエッペンチューブに加え、 $37\,\mathrm{C}$ 、12時間インキュベーションした。反応停止は $50\,\mathrm{C}$ 酢酸 $200\,\mu$ l を添加して行った。

なお、合成基質 S 2 2 3 8 の 5 0 m M トリス塩酸 0.1M NaCl 溶液(pH7.4)と、5 0 m M トリス塩酸 0.1M NaCl (pH7.4)を、2 0 0 μ l ずつエッペンチューブに加え、37 \mathbb{C} 、1 2 時間 インキュベーションしたものをコントロールとした。

12時間インキュベーションした後のコントロールの吸光度は、インキュベーション前に比べて0.005増加した。被験サンプルの12時間インキュベーション終了後の吸光度の増加が、インキュベーション前の吸光度に比べて0.05以下の場合は測定限界以下であると判定した。

方法Aにおいて活性が認められないレベルに活性が低下したトロンビンに関しては、さらに以下の方法B又はC又はDいずれかの活性測定を行った。

$[0\ 0\ 5\ 1]$

方法B:FXIIIとしてフィブロガミンP(アベンティス ファーマ)を用いた。 3 m l のフィブロガミンP 250 単位を50 m M EDTA、0.1 M NaCl (pH7.4) に透析した溶液 50μ l に対し、被験サンプル0.1 mg/ml (トロンビン誘導体)のPBS溶液(pH7.4) 100μ l をエッペンチューブに加え、37 C、3 時間 インキュベーションした後、SDS-PAGEによってFXII lの活性化の有無を確認した。目視で分解産物が確認される場合にSDSPAGEを一SH条件下で行いFXIIIのA鎖及び活性化A鎖のバンドの濃さをライトキャプチャー(アトー株式会社)

を用い解析比較した。

[0052]

方法 $C: 50\,\text{mM}$ トリス塩酸 $0.1\,\text{M}$ Na CI (pH7.4) に溶解した $4\,\text{m}$ g/m 1 フィブリノゲン溶液 $2\,0\,0\,\mu$ 1 に、 $0.2\,\text{m}$ g/m 1 に調整された被験サンプル(トロンビン誘導体)を $1\,0\,0\,\mu$ 1 添加し良く混和したのち、 $37\,\text{C}$ 、3 時間のインキュベーションを行った。 3 時間後のクロット形成の有無を目視によって判断した。

[0053]

方法D: $50\,\text{nM}$ トリス塩酸 $0.1\,\text{M}$ NaCl pH7.4に溶解した $0.1\,\text{mg/ml}$ トロンビンレセプター細胞外ドメインペプチド(配列番号 4)溶液 $200\,\mu$ l に、 $0.3\,\text{mg/ml}$ に調整された被験サンプル(トロンビン誘導体)を $100\,\mu$ l 添加し 良く混和したのち、 $37\,\text{C}$ 3時間のインキュベーションを行った。 $50\,\text{M}$ 酢酸 $200\,\mu$ l を添加して反応を停止した後、SDS-PAGEによってトロンビンレセプターの活性化の有無を確認した。目視で分解産物が確認される場合にSDSPAGEを-SH条件下で行いトロンビンレセプターの分解産物のバンドの濃さをライトキャプチャー(アトー株式会社)を用い解析比較した。

 $[0\ 0\ 5\ 4]$

< 2 > 基質結合能の測定法

方法E:ヒルジンC末端ペプチド(配列番号3)への結合性の確認

(1) ヒルジン(末端ペプチドゲルの作製

ヒルジン(末端ペプチド1 0 \mathbf{m} \mathbf{g} \mathbf{e} 0. 1 \mathbf{M} NaHCO $_3$ 緩衝液に溶解し、同緩衝液に置換したNHS活性化セルロファイン(チッソ社)1 0 \mathbf{m} 1 \mathbf{e} \mathbf{m} \mathbf{e} \mathbf{m} \mathbf{e} \mathbf{m} \mathbf{e} \mathbf{m} \mathbf{e} \mathbf{m} \mathbf{e} \mathbf{m} \mathbf{e} $\mathbf{$

ここに 1 Mトリス塩酸 pH8 2 5 \mathbb{C} 2 0 m 1 e m

(2) ヒルジン(末端ペプチド(配列番号3)への結合性の確認 ヒト野生型トロンビンもしくはトロンビン誘導体を含有する分画の2m1を、50mMトリス塩酸 0.15MN aCl(pH8) 4 Cに平衡化したヒルジン(末端ペプチドカラム10m1に添加し、30m1の50mM トリス塩酸緩衝液で洗浄後、50mM トリス塩酸1MN aCl 3M 尿素(pH8)で溶出した。抗ヒトトロンビン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより素通り分画、および溶出分画のトロンビンを確認した。なお、本実験では50%以下の担体への結合の誘導体は基質結合能を喪失していると判断した。

[0055]

方法F:バイオセンサー(lAsys日製産業)を用いたトロンビン誘導体のトロンビンレセプター結合能の測定

(1)トロンビン誘導体固定化キュベットの作製

被験サンプル(トロンビン誘導体) $10\,\mathrm{mM}$ リン酸バッファー($\mathrm{pH7.7}$)を、NHS活性化 CM デキストランキュベット(日製産業社) $10\,\mathrm{分間}$ $25\,\mathrm{C}$ で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS活性化 CM デキストランキュベットに固定し、トロンビン誘導体固定化キュベットを得た。引き続き $1\,\mathrm{M}$ エタノールアミン($\mathrm{pH8}$)を $0.2\,\mathrm{mlm}$ えブロッキング処理を行った。

(2)約1000、500、200、100、50、25、10nMに調整した トロンビンレセプター細胞外ドメインペプチド(配列番号 4)の50mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl 溶液(pH7.4)0.1m lを、(1)で得られたトロンビン誘導体固定化キュベットに加え結合曲線を解析した。解析はFAST fit(日製産業)を用い同社マニュアルに順じて行った。

[0056]

< 3 > APTT測定方法

本実施例において方法に関し特に指定が無い限り、APTTの測定は下記の方法にて行った

標準血漿(国際試薬社)とサンプルを混和し、総量の25%のAPTT試薬(国際試薬社)を加え37% 5分インキュベーションを行う。<math>5分後 0.1M $CaCl_2を8\mu$ Mになるよ

うに添加しカルシウム添加後 凝固までの時間を測定する。

[0057]

<4>アンヒドロトロンビンの合成

本実施例中のアンヒドロトロンビンは下記の実験方法によって得たものを使用した。

4-1:アンヒドロトロンビン(AhT)の合成

ヒトThrombin60mgを100μM PIPES pH6.5 50mlに溶解しAPMSF (WAK0社) 1 0 m g を加え10 分攪拌した。つづいて溶解サンプルを氷水で冷却し、1 N NaOH を6ml加え、10分間反応させた後(氷水中で反応)、5 M NaCl 14mlとglycerol 70mlを加え攪拌し、1 M PIPES (pH6.5)にてpH8.0へ調整した。さらに、0.1M NaHCO3 - 0.5M NaCl 560ml 中へ、調整サンプルを滴下希釈し、0.1M NaHCO3 - 0.5M NaClにて透析を行った。引き続き透析サンプルを、8.000rpm 5min. 遠心沈殿除去後、サンプルを最終100mlへ濃縮した。

Anti-Thrombin (AT) 50単位/ml 1 ml にHeparine 10 m g を加えたものを濃縮後のサンプルに加え、50 mM NaHCO3 - 0.3 M NaClに透析する。その後、8.000 rpm 5 min. 遠心沈殿除去した。

[0058]

4-2:AhTの精製

50mM NaHCO3にて平衡化したBenzamidine-Separose(50ml)にAで得られたサンプル50mlを添加し(流速2ml/min)、50mM NaHCO3 - 0.1M NaClにて洗浄後、0.1M Benzamidine - 50mM NaHCO3 - 0.1M NaClにて溶出した。BCAにて蛋白の確認をし、AhT蛋白の含まれる画分を、50mM NaHCO3にて平衡化したHeparine-Separoseに添加し(流速2ml/min)その後、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて洗浄し、benzamidine除去後、1mM PIPES - 1M NaCl pH6.5にてAhTを溶出させた。溶出画分に、APMSFを10mg添加し、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5に透析した。

[0059]

4-3:2回目ベンズアミジン精製

つづいて再度カラム添加直前に、サンプルにAPMSFを 1 m g 加え、1mM PIPES pH6.5にて平衡化したBenzamidine-Separoseカラムに添加した。1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて洗浄後、0.1M Benzamidine - 1mM PIPES - 0.1M NaCl pH 6.5にて溶出し、1 mM PIPES pH6.5にて平衡化したHeparine-SeparoseにAhT画分を添加し、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて洗浄後、1mM PIPES - 1M NaCl pH6.5にて溶出させた。

 $[0\ 0\ 6\ 0\]$

4-4:3回目ベンズアミジン精製

得られたサンプルにAPMSFを10mg添加し、1mM PIPES - 0.1M NaCl pH6.5にて透析後、2回目ベンズアミジン精製同様の操作にてAhTを精製し、ヘパリン溶出AhTに再度1mgのAPMSFを添加した。約30mgのアンヒドロトロンビンが回収された。

 $[0\ 0\ 6\ 1]$

[実験例1]

(1)ヒト野生型トロンビンの発現

[0062]

(2)ヒト野生型トロンビンのエカリンによる活性化及び活性化ヒト野生型トロンビンのヒルジン(末端ペプチドカラム結合性の確認

得られたヒト野生型トロンビンを 5 m g 含む分画約 1 0 0 m 1 を 2 リットルの 5 0 m M トリス塩酸緩衝液、 0 . 1 5 M NaCl, 5 m M、CaCl $_2$ (pH8) 溶液に透析した後 エカリン (シグマ社) 1 0 0 unitsを加え 37 \mathbb{C} 24時間インキュベーションした。エカリン処理後の一部を用い方法 E 記載のヒルジン C 末端結合実験を行ったところ、素通り分画にはトロンビンは確認できず、溶出分画にトロンビンのバンドが確認された。

[0063]

(3)ヒト野生型トロンビンの精製

$[0\ 0\ 6\ 4]$

[実験例2]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをグリシンに置換したトロンビン (以下203A205Gトロンビン) の発現

203A205GトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。 203A205Gトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号7に示す。

203A205Gトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC 末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じて硫酸化セルロファイン、ヒルジンC 末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上でほぼ純化された203A205Gトロンビンが約5 mg 得られた。

[0065]

- (2) 203A 205Gトロンビンの基質分解活性測定
- (1)で得られた203A205Gトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の有意な増加はみられなかった。

さらに、203A205Gトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。さらに、203A205Gトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Cに従って測定した結果、クロット形成は確認されなかった。

$[0\ 0\ 6\ 6]$

- (3)203A205Gトロンビンのトロンビンレセプターへの結合能の確認
- (1)で得られた203A205Gトロンビンのトロンビンレセプターへの結合能を、前述の方法Fに従って測定した。203A205Gトロンビンのトロンビンレセプターの解離定数は 3.2μ Mであった。

$[0\ 0\ 6\ 7]$

(4) 203A205Gトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定

 50μ g/mlの203A205Gトロンビン(PBS;137mM NaCl,2.68mM KCl,8.1mM Na $_2$ HPO4,1.47mM KH $_2$ PO $_4$ (pH7.4)を 100μ 1を標準血漿(国際試薬社) 100μ 1と混合し、APTTを測定した。PBSのみを同様に添加した標準血漿をコントロールとして測定したところ、コントロールが44秒、203A205Gトロンビンでは48秒であった。

[0068]

(5)PRP(多血小板血漿:platelet rich plasma)を用いた203A205Gトロンビンの抗血

小板機能の評価

評価1:採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\mathrm{ml}$ を、 $800\,\mathrm{rpm}$ で15分遠心し、上澄みより $\mathrm{PRP2ml}$ を得た。さらに $2500\,\mathrm{rpm}$ で10分遠心分離することにより PPP (乏血小板血漿: $\mathrm{platelet}$ $\mathrm{poorplasma}$)を得た。 $100\,\mu$ 1添加した場合に $203\,\mathrm{A}\,205\,\mathrm{G}$ トロンビンの終濃度が $80\,\mu$ g/m 1となるように濃度が調整された、 $203\,\mathrm{A}\,205\,\mathrm{G}$ トロンビンの $5\,\mathrm{mM}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl ($\mathrm{pH7}$. 4) 溶液 $100\,\mu$ 1を $\mathrm{PRP130}\,\mu$ 1に添加し、血小板凝集惹起物質として $5\,\mathrm{m}$ g/m 1リストセチン $5\,\mathrm{mM}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl ($\mathrm{pH7}$. 4) 溶液 $35\,\mu$ 1を添加した。コントロールとして、 $\mathrm{PRP130}\,\mu$ 1に、 $5\,\mathrm{mM}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl ($\mathrm{pH7}$. 4) $100\,\mu$ 1を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率(波長 $10\,\mathrm{mm}$)の測定は $10\,\mathrm{mm}$ 2の $10\,\mathrm{mm}$ 3の $10\,$

評価 2 : 血小板凝集惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン(ヒト野生型) $5\,m$ M リン酸緩衝液 0.15 M NaCl (pH7.4) 溶液を用いた以外は、評価(1)の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ 1 に、 $5\,m$ M リン酸緩衝液 0.15 M NaCl (pH7.4) $100\,\mu$ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800 (東京光電株式会社)を用いて行った。結果を図 1 2 に示す

[0069]

(6) 203A205Gトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

203A205Gトロンビン誘導体またはアンヒドロトロンビンの約0.1 mg/mlの10 mM リン酸緩衝液(pH7.4)溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25 $\mathbb C$ で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、203A205Gトロンビンまたはアンヒドロトロンビン固定化キュベットを得た。(各キュベットに203A205Gトロンビンは4100 arc、アンヒドロトロンビンは2400 arcそれぞれ結合した。)引き続き 1 M エタノールアミン(pH8)を0.2 ml加えブロッキング処理を行った。

203A205Gキュベットまたはアンヒドロトロンビンキュベットにそれぞれ100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図13と図14に示す。

図14よりアンヒドロトロンビンキュベットにはフィブリノゲンとFVIIIがほぼ同程度結合しているのに対し、図13より203A205GキュベットにはFVIIIの方がフィブリノゲンより少ない結合が確認された。構造変化を最小にするため単純に活性中心セリンをデヒドロアラニンに変換する事で得られたアンヒドロトロンビンに比較し、203A205Gトロンビンは低いFVIII特異性を有している事が分かった。

又、アンヒドロトロンビンに対し203A205Gトロンビンは固相化量との比で換算にFVIII結合が約11%に低下していた。

そのため203A205GトロンビンはAPTT延長効果が低いものと考えられた。

[0070]

(7)カルボキシル基修飾203A205Gトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APT))及びプロトロンビン時間(PT)の測定

1 mg/5 ml の 203 A 205 Gトロンビン/5 0 m M リン酸緩衝液 0.5 M NaCl (pH6.5) を 0.25 M グリシンエチルエステル 0.5 M NaCl (pH6.5) に 4 C で 3 時間透析した後、1-E thyl-3-(3-d imethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬)を、その濃度が 20 mg/mlになるように添加し、25 Cにて 1 時間 インキュベーションし、203 A 205 Gトロンビンのカルボキシル基を修飾した。残存カルボジイミドは終濃度 0.5 Mになるようにグリシンを添加し反応を終了させた。

質量分析の結果分子量約1400増加しており約15個のカルボキシル基が修飾されていた

$[0\ 0\ 7\ 1]$

評価1:APTT測定1

修飾された203A205Gトロンビン500 μ gを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 1 m 1 に溶解したもの50 μ lを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:10の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) を、標準血漿(国際試薬社)に1:10(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは38秒であったのに対し、カルボキシル基修飾203A205GトロンビンのAPTTは65秒であった。

評価2:APTT測定2

修飾された203A205Gトロンビン 50μ gを、1m1のPBSに溶解したもの 100μ lを、標準血漿(国際試薬社) 100μ lに添加し、APTTを測定した。PBSを標準血漿(国際試薬社)に同様に添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは44秒であったのに対し、カルボキシル基修飾203A205GトロンビンのAPTTは85秒であった。

$[0 \ 0 \ 7 \ 2]$

評価3:PTの測定

修飾された203A205Gトロンビン 500μ gを、5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 1 m 1 に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:10の割合となるように添加し、PTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) を、標準血漿(国際試薬社)に1:10 (容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは20秒であったのに対しカルボキシル基修飾203A205GトロンビンのPTは21秒であった。

[0073]

(8) PRP (多血小板血漿: platelet rich plasma) を用いたカルボキシル基修飾203A2 05Gトロンビンの抗血小板機能の評価

評価 2 : 血小板凝集惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン(ヒト野生型) 5 m M リン酸緩衝液 0.15 M NaCl (pH7.4) 溶液を用いた以外は、評価 1 の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ 1 に、5 m M リン酸緩衝液 0.15 M NaCl (pH7.4) 100 μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800 (東京光電株式会社)を用いて行った。結果を図2に示す。

図1、図2より、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを用いることによって血小板 凝集が低下したことから、該トロンビン誘導体はリストセチン惹起血小板凝集及び修飾トロンビン惹起血小板凝集において抗血小板効果を示すことがわかった。

$[0\ 0\ 7\ 4]$

以上の結果から、203A205Gトロンビンは、活性が検出限界以下に低下しているが、基質への結合能は保持していることがわかった。また、APTTの結果および血小板凝集抑制実験の結果から、203A205Gトロンビンは 80μ g/mlにおいては抗血栓効果、抗血小板効果を有

していなかったが、約15個のカルボキシル基が修飾を受けたカルボキシル基修飾203A2056トロンビンは低濃度においても十分な抗血栓効果、抗血小板効果を有していることがわかった。

また、IAsysを用いた基質特異性実験より203A2056トロンビンはFVIII特異性が低く、また結合力もアンヒドロトロンビンに比較し固定化蛋白対比では11%程に低下しているため高いAPTT延長効果が無いことが推測される。化学修飾を行った203A2056トロンビンは後の実験で示す205A43Aトロンビン同等のAPTT延長効果であったが、血小板凝集抑制効果においては205A43Aトロンビンに比較し非常に強い効果を示した。化学修飾を行った205A43Aトロンビンと比較した場合、化学修飾を行った203A2056 トロンビンはAPTT延長効果は弱いものも血小板凝集抑制効果は同等に強い性質を示した。

[0075]

- (9) 203A205Gトロンビンのカルボキシル基修飾個数と抗血栓性の関係の評価
- (9)-1.修飾個数1から10個のカルボキシル基修飾203A205G誘導体の作製

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide(和光純薬)を終濃度 $2 \text{ mg} \sim 2 \text{ 0mg}$ gになるように加え 2 5 \mathbb{C} にて 6 0 分~120分インキュベーションを行い、203 A205 Gトロンビンの 2個~28個のカルボキシル基を修飾した修飾誘導体 $1 \sim 5$ を得た。

[0076]

(9) −2. PBSに透析した修飾誘導体1~5のAPTT延長効果

修飾された203A205Gトロンビン 50μ gを、1m1のPBSに溶解したもの 100μ lを、標準血漿(国際試薬社) 100μ lに添加し、APTTを測定した。PBSを標準血漿(国際試薬社)に同様に添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。

結果を以下に示す。

203A205Gトロンビン 約0個修飾 APTT 4 7 秒 203A205Gトロンビン修飾誘導体1 48秒 約1個修飾 APTT 56秒 203A205Gトロンビン修飾誘導体2 約3個修飾 APTT 203A205Gトロンビン修飾誘導体3 APTT 61秒 約5個修飾 77秒 203A205Gトロンビン修飾誘導体4 約10個修飾 APTT 203A205Gトロンビン修飾誘導体5 約26個修飾 APTT - 6 0 秒

以上よりEDCを用いた203A205Gトロンビンにおいて3 個以上のカルボキシル基修飾によって顕著なAPTT延長効果が確認された。修飾体 $1\sim4$ における修飾前後における回収率は75%以上であった。26 個修飾された誘導体においてはAPTT延長効果は見られるものの、凝集がおき、回収率が40%と低く過度な修飾による回収率の低下が起こることが分かった。

$[0 \ 0 \ 7 \ 7]$

[実験例3]

(1) B鎖205セリンをアラニンに置換したトロンビン(以下205Aトロンビン)の発現205AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号9に示す。

205Aトロンビンを実験例1の(1)の方法に準じて発現させた。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。<math>SDS-PAGE上 ほぼ純化された205Aトロンビンが約6mg得られた。

[0078]

- (2) 205Aトロンビンの基質分解活性測定
- (1)で得られた205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を前述の方法Bに従って測定した結果、活性化されたFXIIIのA鎖は確認されなかった。

[0079]

(3)205Aトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定

205 Aトロンビン500 μ gを、PBS 1 m 1 に溶解した溶液100 μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55 秒であったのに対し、205 AトロンビンのAPTTは95 秒であった。

205Aトロンビン50 μ 8を、PBS 1 m l に溶解した溶液100 μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは4 l 秒であったのに対し、205AトロンビンのAPTTは6 2 秒であった。

[0080]

さらに、lmg/5mlの205Aトロンビン/50 m M リン酸緩衝液 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4 \mathbb{C} で 3 時間透析した後 1 - E thyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬)を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、25 \mathbb{C} にて 1 時間 インキュベーションし、205Aトロンビンのカルボキシル基を修飾した。約80%の修飾誘導体が可溶化状態で得られた。

カルボキシル基修飾205Aトロンビン 50μ gを、PBS $1\,m$ 1に溶解した溶液 100μ 1を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTは42秒であったのに対し、カルボキシル基修飾205AトロンビンのAPTTは79秒であった。

[0081]

(4) プロトロンビン時間 (PT) の測定

205Aトロンビン及びカルボキシル基修飾205Aトロンビン 50μ gを、PBS1mlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは21秒であったのに対し205Aトロンビンは21秒、カルボキシル基修飾205AトロンビンのPTは20秒でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

[0082]

(5) PRP (多血小板血漿: platelet rich plasma) を用いた205Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価 1 : 採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\text{ml}$ を、 $800\,\text{rpm}$ で $15\,\text{分遠心}$ し、上澄みより $PRP\,2\,\text{ml}$ を得た。さらに $2800\,\text{rpm}$ で $10\,\text{分遠心}$ 分離することによりPPP (乏血小板血漿:platelet poo r plasma) を得た。 $100\,\mu$ 1 添加した場合に $205\,\text{A}$ トロンビンの終濃度が $70\,\mu$ g/m 1 となるように濃度が調整された、 $205\,\text{A}$ トロンビンの $5\,\text{mM}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\text{M}$ NaCl (pH 7.4) 溶液 $100\,\mu$ 1 を $PRP\,130\,\mu$ 1 に添加し、血小板凝集惹起物質として $5\,\text{mg/ml}$ リストセチン $5\,\text{mM}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\text{M}$ NaCl (pH 7.4) 溶液 $35\,\mu$ 1 を添加した。コントロールとして、 $PRP\,130\,\mu$ 1 に、 $5\,\text{mM}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\text{M}$ NaCl (pH 7.4) 溶液 $35\,\mu$ 1 を添加した。コントロールとして、 $PRP\,130\,\mu$ 1 に、 $5\,\text{mM}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\text{M}$ NaCl pH 7.4 $100\,\mu$ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率(波長 $700\,\text{nm}$) の測定は $EASY\,TR\,ACER\,ET$ -800 (東京光電株式会社)を用いて行った。しかしながら本実験で $70\,\mu$ g/mlにおいて血小板凝集抑制効果は確認されなかった。

評価 2 : 血小板凝集惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン(ヒト野生型) $5\,\mathrm{m\,M}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl (pH7.4) 溶液を用いた以外は、評価(1)の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ 1 に、 $5\,\mathrm{m\,M}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl (pH7.4) $100\,\mu$ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定はEASY TRACER ET-800 (東京光電株式会社)を用いて行った。しかしながら本実験で $70\,\mu$ g/mlにおいては血小板凝集抑制効果は確認されなかった。

以上より、205Aトロンビンは弱いAPTT延長効果が確認された。しかしながら抗血小板効果は確認されなかった。

[0083]

(6) PRPを用いた修飾205Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価 1 : 採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\mathrm{ml}$ を、 $800\,\mathrm{rpm}$ で $15\,\mathrm{分遠心}$ し、上澄みより $PRP\,2\,\mathrm{ml}$ を得た。さらに $2800\,\mathrm{rpm}$ で $10\,\mathrm{分遠心}$ 分離 することにより PPP を得た。 $100\,\mu$ 名 $100\,\mu$ 名

[0084]

(7) 205Aトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

205Aトロンビン約 0.1 mg/ml の濃度の10 mM リン酸緩衝液(pH7.7)溶液を、それぞれNHS 活性化0 M デキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10 分間、25 C で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS 活性化0 M デキストランキュベットに固定し、205 A トロンビン固定化キュベットを得た。(約600 ar 0 D 間相化)引き続き 1 M エタノールアミン(0 P H8)を0.2 m 1 加えブロッキング処理を行った。

205Aトロンビンキュベットに100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図23に示す。図23より205AトロンビンはFVIII特異性が増していたがFVIII結合シグナルそのものが相対的にアンヒドロトロンビン(図14)に比較し40%程度にまで低下した。この為、195Aトロンビンはそれほど強い抗血栓能を示さなかったと考えられる。また、195Aトロンビンは修飾することでAPTT延長効果を増し、且つ修飾トロンビン惹起血小板凝集、リストセチン惹起血小板凝集両方に対し抑制効果を示した。

[0085]

[実験例4]

(1) B鎖205セリンをスレオニンに置換したトロンビン(以下205Tトロンビン)の発現205TトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Tトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号11に示す。

205Tトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現させた。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じて硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上 ほぼ純化された205Tトロンビンが約5mg得られた。

[0086]

(2) 205Tトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205Tトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、205Tトロンビンの基質分解活性は、ヒト野生型トロンビンに比較し約 2 . 5 x 1 0 $^{-4}$ の活性であった。

さらにトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、ほぼ全てのFXIIIのA鎖は野生型トロンビン同様の活性化を受け、分解された活性化血液凝固XIII因子のバンドが確認された。以上より、205Tトロンビンは活性が残存していることがわかった。

[0087]

[実験例5]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをアラニンにB鎖99アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン(203A205A99Nトロンビン)の発現

203A205A99NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成

した。203A205A99Nトロンビン塩基配列を配列番号13に示す。

203A205A99Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。<math>SDS-PAGE上ほぼ純化された203A205A99Nトロンビンが約5mg得られた。

[0088]

- (2) 203A205A99Nトロンビンの基質分解活性測定
- (1)で得られた203A205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、203A205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って 測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。

[0089]

(3) 203A205A99Nトロンビン添加血液のAPTTの測定

203A205A99Nトロンビン 100μ gを5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) 1 m 1 に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。5mM PIPES緩衝液 0.15M NaCl (pH7.4) を、標準血漿(国際試薬社)に容量比1:1 の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55 秒であったのに対し、203A205A99NトロンビンのAPTTは60 秒であった。以上より、203A205A99Nトロンビンはヒルジンゲルへの結合能を有し且つ、活性が十分に低下しているものも十分な抗血栓効果を有していないことがわかった。

[0090]

[実験例6]

(1)B鎖205セリンをバリンに置換したトロンビン(以下205Vトロンビン)の発現

205VトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Vトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号15に示す。

205Vトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Vトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

 $[0 \ 0 \ 9 \ 1]$

[実験例7]

(1)B鎖205セリンをアスパラギン酸に置換したトロンビン(以下205Dトロンビン)の発現

205DトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Dトロンビン塩基配列を配列番号 17に示す。

205Dトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Dトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

[0092]

[実験例8]

(1) B鎖205セリンをアスバラギンに置換したトロンビン(以下205Nトロンビン)の発現205NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205Nトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号19に示す。

205Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にほぼすべてのトロンビンのバンドが現われ、溶出ピークにはトロンビンのバンドが確認されなかった。これにより、205Nトロンビンは基質結合能が低下していることがわかった。

[0093]

[実験例9]

アンヒドロトロンビンのトロンビンレセプター結合能の測定を、方法 D により測定したところ、該アンヒドロトロンビンとトロンビンレセプターの解離定数は1.2μMであった。

[0094]

[実験例10]

(1)B鎖205セリンをアラニンにB鎖99アスパラギン酸をアスパラギンに置換したトロンビン (205A99Nトロンビン) の発現

205A99NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した

205A99Nトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号21に示す。

205A99Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。<math>SDS-PAGE上ほぼ純化された205A99Nトロンビンが約5.5mg得られた。

[0095]

(2) 205A99Nトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、205A99Nトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。

[0096]

(3) 205A99Nトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定 205A99Nトロンビン 50μ gを、PBS 1mlに溶解し、その 100μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に 100μ 1 と混和し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、205A99NトロンビンのAPTTは58秒であった。

[0097]

[実験例11]

(1) B鎖203 グリシンをアラニンにB鎖205セリンをアラニンに置換したトロンビン(203 A 205 Aトロンビン)の発現

203A205AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。203A205Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号23に示す。

203A205Aトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された203A205Aトロンビンが約4mg得られた。

[0098]

(2) 203A205Aトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた203A205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、203A205Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。203A205Aトロンビンはヒルジン05Aトロンビン05Aトロンビン05Aトロンビン000 0

るように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは55秒であったのに対し、203A205AトロンビンのAPTTは59秒であった。

[0099]

(3)カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、lmg/5mlの203A205Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5)を<math>0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5)に4 \mathbb{C} で3時間透析した後 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬)を、その濃度が<math>20mg/mlになるように添加し、2.5 \mathbb{C} にて 1 時間 インキュベーションし、203A205Aトロンビンのカルボキシル基を修飾した。可溶化状態で約<math>80%の修飾体が回収された。

カルボキシル基修飾203A205Aトロンビン 50μ gを、PBS 1 m 1 に溶解した溶液 100μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 で添加したものをコントロールとし、APTT を測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、カルボキシル基修飾203A205Aトロンビンはそれぞれ46秒であった。

$[0\ 1\ 0\ 0\]$

(4) プロトロンビン時間 (PT) の測定

203A205Aトロンビン及びカルボキシル基修飾203A205Aトロンビン50 μ gを、PBS1m1に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBO PLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは20秒であったのに対し203A205Aトロンビンは21秒、カルボキシル基修飾203A205AトロンビンのPTは20秒でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

$[0\ 1\ 0\ 1\]$

(5) PRPを用いた203A205Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価 1 : 採血直後のクエン酸添加全血10m1を、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2m1を得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。 100μ 1添加した場合に203A205Aトロンビンの終濃度が、 100μ g/m1になるように濃度が調製された、203A205AトロンビンのPBS溶液を、 100μ 1ずつ $PRP130\mu$ 1に添加し、惹起物質として(i) 1μ g/m1カルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液、(ii)5mg/m1リストセチン PBS溶液 35μ 1を添加した。コントロールとして、 $PRP130\mu$ 1に、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaC1、<math>pH7.4 100μ 1を添加し血小板凝集抑制実験を行ったが(i)(ii)いずれの惹起物質に対してもコントロールと203A205Aトロンビンに違いは無かった。

[0102]

(6)203A205Aトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

203A205Aトロンビン約0.1mg/mlの濃度の10mM リン酸緩衝液(pH7.7)溶液を、それぞれ NHS活性化0Mデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25 $\mathbb C$ で撹拌することにより、被験サンブル(トロンビン誘導体)をNHS活性化0Mデキストランキュベットに固定し、203A205Aトロンビン固定化キュベットを得た。(約600arc固相化)引き続き 1M エタノールアミン(pH8)を0.2ml加之ブロッキング処理を行った。203A205Aトロンビンキュベットに100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図 24 に示す。図 24 より203A205AトロンビンはFVIII及びフィブリノゲン両方にアンヒドロトロンビンと比較すると固定化蛋白量との対比による値で約5%のシグナルしか示さなかった。本配列の誘導体の基質結合能そのものが低下しそれによって抗凝固能を有さなかった推測される。

$[0\ 1\ 0\ 3]$

[実験例12]

(1) B 鎖 2 0 5 セリンをアラニンに、B 鎖 4 3 ヒスチジンをアラニンに置換したトロン

ビン (205A43Aトロンビン) の発現

205A43AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205A43Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号25に示す。

205A43Aトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。<math>SDS-PAGE上ほぼ純化された205A43Aトロンビンが約3mg得られた。

$[0\ 1\ 0\ 4\]$

(2) 205A43Aトロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205A43Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

205A43Aトロンビン 50μ gを、PBSImIに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは46秒であったのに対し、205A43AトロンビンのAPTTは78秒であった。

$[0\ 1\ 0\ 5]$

(3) PTの測定:205A43Aトロンビン 50μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。またPBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは24秒であったのに対し、205A43AトロンビンのPTは25秒であった。

[0106]

(4) カルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の測定

1 mg/5ml の 205 A43G トロンビン $\angle / 5$ 0 \mathbf{m} M リン酸緩衝液 $\angle / 0$. 5 M MaCl (pH6.5) を 0.2 5 M グリシンエチルエステル $\angle / 0$. 5 M NaCl (pH6.5) に 4 $\mathbb C$ で 3 時間透析した後、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬) を、その濃度が 20 mg/ml になるように添加し、 25 $\mathbb C$ にて 1 時間 インキュベーションし、 205 A43A トロンビンのカルボキシル基を修飾した。修飾体の質量分析の結果、約 16 個のカルボキシル基が修飾された。

$[0\ 1\ 0\ 7]$

修飾された205A43Aトロンビン 50μ gをPBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは46秒であったのに対し、修飾205A43AトロンビンのAPTTは190秒であった。

[0108]

(5)プロトロンビン時間(PT)の測定

カルボキシル基修飾 205A43Aトロンビン 50μ gを、PBS 1 m 1 に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で 1:1 の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に 1:1 (容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬には SIGMA社の THROMBOPLASTIN WITH GALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは 22秒であったのに対しカルボキシル基修飾 205A43AトロンビンのPTは 23秒であり修飾体においても 205A43AトロンビンはPTの延長効果は示さなかった。

$[0\ 1\ 0\ 9\]$

(6) PRPを用いた205A43Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価1:採血直後のクエン酸添加全血10mlを、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを

得た。さらに2800 r pmで10分遠心分離することによりPPPを得た。 100μ 1添加した場合に205A43Aトロンビンの終濃度が、 30μ g/m1になるように濃度が調製された、205A43AトロンビンのPBS溶液を、 100μ 1ずつPRP1 30μ 1に添加し、惹起物質として5 mg/mlリストセチン PBS溶液 35μ 1を添加した。コントロールとして、PRP1 30μ 1に、5 mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100μ 1を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図3に示す。

評価 2 : 惹起物質として 1μ g /ml カルボキシル基修飾トロンビン PBS 溶液を用いた以外は、評価 1 の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、 PRP 130μ 1 に、 PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図 4 に示す。

評価3: 惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用い 100μ l 添加した場合に205A43Aトロンビンの終濃度が、それぞれ 120μ g/ml、205A43AトロンビンのPBS溶液を加え、評価1の方法に準じて実験を行った。結果を図15に示す。

評価 4:205A43Aトロンビンの終濃度が、 150μ g/mlになるように濃度が調製された、205A43AトロンビンのPBS溶液を、 100μ 1ずつPRP1 30μ 1に添加し、惹起物質として 5 mg/mlリストセチン PBS 溶液 35μ 1を添加した。コントロールとして、PRP1 30μ 1に、PBS 100μ 1を添加し透過率の経時変化を記録した。205A43Aトロンビンは高濃度においてもリストセチン惹起血小板凝集抑制効果は確認されなかった。

[0110]

(7) PRPを用いたカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンの抗血小板機能の評価

評価 1 : 採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\mathrm{ml}$ を、 $800\,\mathrm{rpm}$ で 15 分遠心し、上澄みより PRP $2\,\mathrm{ml}$ を得た。さらに $2500\,\mathrm{rpm}$ で 10 分遠心分離することにより PPP を得た。 $100\,\mu$ 1 添加した場合、カルボキシル基修飾 $205\,\mathrm{A43A}$ トロンビンの終濃度が、それぞれ $30\,\mu$ g $/\mathrm{ml}$ 、 $15\,\mathrm{ml}$ 以 $15\,\mathrm{ml}$ 以 1

評価 2 : 惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン 5 m M リン酸緩衝液 0.15 M NaCl (pH7.4) 溶液を用いた以外は、評価(1)の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ 1 に、5 m M リン酸緩衝液 0.15 M NaCl (pH7.4) 100 μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。なお、透過率の測定は EASY TRACER ET-800 (東京光電株式会社)を用いて行った。結果を図 $8 \sim 1$ 0 に示す。

(8) 205A43Aトロンビン及びアンヒドロトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合 特異性の比較

205A43Aトロンビン誘導体及びアンヒドロトロンビンの約0.1mg/mlの濃度の10mM リン酸緩衝液(pH7.7)溶液を、それぞれNHS活性化0Mデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25 $\mathbb C$ で撹拌することにより、被験サンブル(トロンビン誘導体)をNHS 活性化0Mデキストランキュベットに固定し、205A43Aトロンビン及びアンヒドロトロンビン固定化キュベットを得た。1307arcの205A43Aトロンビンがキュベットに固定化された。引き続き 1 M エタノールアミン(pH8)を0.2ml加之ブロッキング処理を行った。205A43A キュベット及びアンヒドロトロンビンキュベットに100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図 16 および図 14 に示す。図 14 よりアンヒドロトロンビンキュベットにはフィブリノゲンとFVIIIがほぼ同程度結合しているのに対し、図 16 から 205A43Aキュベットには1000 m で 1000 m

[0112]

(9) 205A43Aトロンビンの修飾個数とAPTT延長効果の実験

lmg/5mlの205A43Aトロンビン/50mMリン酸緩衝液 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4℃で3時間透析した後、1-Ethyl-3-(3-d imethylaminopropyl)-carbodiimide(和光純薬)を、その濃度が20mg/mlになるように添加 し、25℃にて10分、60分、120分反応させカルボキシル基を修飾した。各反応時間に残 存カルボジイミドを終濃度 0.5Mになるようにグリシンを添加し反応を終了させた。

未反応205A43Aトロンビンに比較し10分反応サンプルは約480Da増加(5.6個修飾に相 当) 60分後 1240Da増加(14.6個修飾に相当)、120分後 1900(22.4個修飾に相当) するカルボキシル基修飾反応が確認された。

$[0\ 1\ 1\ 3\]$

各修飾体のAPTT延長効果

各修飾体をそれぞれ50、25、12.5μg/mlに調整しPBSに透析した。各サンプルと標準血 漿を1:1に混合しAPTTを測定した。

測定結果を下記に示す。

$[0\ 1\ 1\ 4\]$

【表 1 】

表 1												
	APTT		平均(秒)	比								
透析外液コントロール	42	42	42	1								
O分 サンプル濃度 12.5 μ g/ml	61	62	61.5	1.46								
O分 サンプル濃度 25 µ g/ml	70	71	70.5	1.68								
O分 サンプル濃度 50 µ g/ml	83	80	81.5	1.94								
10分 サンプル濃度 12.5 µ g/ml	87	89	88	2.1								
10分 サンプル濃度 25 µ g/ml	100	103	101.5	2.42								
10分 サンプル濃度 50μg/ml	118	114	116	2.76								
60分 サンプル濃度 12.5 µ g/ml	88	90	89	2.12								
60分 サンプル濃度 25 µ g/ml	110	112	111	2.64								
60分 サンプル濃度 50 µ g/ml	140	143	141.5	3.37								
120分 サンプル濃度 12.5 µ g/ml	88	90	89	2.12								
120分 サンプル濃度 25 µ g/ml	137	125	131	3.12								
120分 サンプル濃度 50 µ g/ml	240	250	245	5.83								

以上の結果より 205A43Aトロンビンにおいては5.6個の修飾においても未修飾よりもAPTT の延長効果の増強が確認された。14.6、22.4個と修飾数が増えるにつれAPTT延長効果は増 加したが 22.4個修飾においては回収率は約50%にまで低下した。回収率とAPTT延長 効果の観点から5個以上の修飾が修飾によるAPTT延長効果には効率的であるが22個以上 の修飾は回収率の低下があることが確認された。

構造変化を最小にするため単純に活性中心セリンをデヒドロアラニンに変換する事で得 られたアンヒドロトロンビンに比較し、205A43Aトロンビンは高いFVIII特異性を有してい る事が分かった。

$[0\ 1\ 1\ 6\]$

 $[0\ 1\ 1\ 5\]$

以上の結果から、205A43Aトロンビン誘導体は化学修飾の有無に関わらず強いAPTT延長 効果を有した。また化学修飾によってさらにAPTT延長効果は増加した。M-トロンビン惹起 血小板凝集抑制(PAR1活性化阻害)に依存した血小板凝集抑制効果は化学修飾の有無にか かわらず有したが、化学修飾後の方が非常に強いものであった。したがって、205A43Aト ロンビン誘導体はAPTTを中心とした血液凝固に主に強く作用し且つおだやかな血小板凝集

抑制効果を有するのに対し、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン誘導体はAPTTと共に強い抗血小板能を有する事が分かった。修飾された205A43AトロンビンはM-トロンビン惹起血小板凝集抑制(PAR1活性化阻害)に加えリストセチン惹起血小板凝集抑制効果も有していたが、修飾をしていない205A43Aトロンビンは高濃度においてもリストセチン惹起血小板凝集を有してはいなかった。よって下記に示される特徴を有した抗血栓トロンビンが得られた。

修飾205A43Aトロンビン

APTT延長効果(大)、PAR1阻害(大)、リストセチン惹起血小板凝集(大)

205A43Aトロンビン

APTT延長効果(大)、PAR1阻害(小)、リストセチン惹起血小板凝集(無し)

また、IAsysを用いた基質特異性確認実験において205A43Aトロンビンが非常に高いAPTT 延長効果を有していた理由として、活性中心セリン及びヒスチジンを同時に変異させた本誘導体がその変異によって、完全に基質分解活性を失うとともに、アンヒドロトロンビンに比較し高いFVIII特異性(フィブリノゲンに対し特異性が低下)を有していたためと推測された。

後述の実験例16および17記載のように他のアミノ酸の置換の組み合わせにおいても活性中心Ser、His を同時に変異させた誘導体はAPTT延長を主効果とした高い抗血栓能を有する事がわかった。

$[0\ 1\ 1\ 7]$

[実験例13]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをグリシンにB鎖77リシンをグルタミン酸に置換したトロンビン(77E203A205Gトロンビン)の発現

77E203A205GトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77E203A205Gトロンビン塩基配列を配列番号27に示す。

77E203A205Gトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77E203A205Gトロンビンが約3mg得られた。

$[0\ 1\ 1\ 8\]$

(2)77E203A205Gトロンビン添加血液のAPTTの測定

77E203A2056トロンビン 50μ gをPBSに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。同様にPBSを、標準血漿(国際試薬社)に容量比1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは44秒であったのに対し、77E203A2056トロンビンのAPTTは74秒であった。

$[0\ 1\ 1\ 9\]$

(3)PRPを用いた77E203A205G トロンビンの抗血小板機能の評価

評価 1 : 採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\mathrm{ml}$ を、 $800\,\mathrm{rpm}$ で 15 分遠心し、上澄みより $PRP2\,\mathrm{ml}$ を得た。さらに $2800\,\mathrm{rpm}$ で 10 分遠心分離することにより PPP を得た。 $100\,\mu$ 1 添加した場合に $77\,\mathrm{E}\,20\,3\,\mathrm{A}\,2\,0\,5\,\mathrm{G}$ トロンビンの終濃度が、 $70\,\mu$ g $/\mathrm{m}\,1$ になるように濃度が調製された、 $77\,\mathrm{E}\,2\,0\,3\,\mathrm{A}\,2\,0\,5\,\mathrm{G}$ トロンビンの PBS 溶液を、 $100\,\mu$ 1 ずつ $PRP130\,\mu$ 1 に添加し、惹起物質として $5\,\mathrm{m}\,\mathrm{g}/\mathrm{ml}$ リストセチン PBS 溶液 $35\,\mu$ 1 を添加した。 コントロールとして、 $PRP130\,\mu$ 1 に、 $5\,\mathrm{m}\,\mathrm{M}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl、 pH7.4 $100\,\mu$ 1 を添加し透過率の経時変化を記録したが リストセチン惹起血小板凝集抑制作用は確認されなかった。

評価 2 : 惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン PBS 溶液を用いた以外は、評価 1 の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、 PRP 130μ 1 に、 PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録したが、カルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制作用を示さなかった。

以上より、203A205Gトロンビンは十分な抗血栓能を有していなかったが77E203A205Gト

ロンビンは77リシンの置換によりフィブリノゲン親和性を低下させることにより大幅なAPTT延長効果の増加が起こった。また、77E203A205Gトロンビンは修飾トロンビン及びリストセチン惹起抗血小板凝集に対し抑制効果を示さなかった。

$[0 \ 1 \ 2 \ 0]$

(4)カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、1mg/5mlの77E203A205Gトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5)を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5)に4℃で3時間透析した後 <math>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide(和光純薬)を、その濃度が<math>20mg/mlになるように添加し、25℃にて1時間インキュベーションし、<math>77E203A205Gトロンビンのカルボキシル基を修飾した。可溶化状態で約<math>35%の修飾体が回収された。

カルボキシル基修飾 77E203A205G トロンビン 50μ gを、PBS 1m1 に溶解した溶液 100μ l を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で 1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に 1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは 45 秒であったのに対し、カルボキシル基修飾 77E203A205GトロンビンのAPTTは 45 秒であった。

$[0 \ 1 \ 2 \ 1]$

(5) プロトロンビン時間 (PT) の測定

77E203A205Gトロンビン及びカルボキシル基修飾77E203A205Gトロンビン 50μ gを、PBS1m1に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHROMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは $20\hbar$ であったのに対し77E203A205Gトロンビンは $22\hbar$ 、カルボキシル基修飾77E203A205GトロンビンのPTは $23\hbar$ でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

$[0 \ 1 \ 2 \ 2]$

(6) PRPを用いたカルボキシル基修飾77E203A205G トロンビンの抗血小板機能の評価評価1:採血直後のクエン酸添加全血10m1を、800rpmで15分遠心し、上澄みよりPRP2mlを得た。さらに2800rpmで10分遠心分離することによりPPPを得た。 $100\mu1$ 添加した場合に修飾77E203A205G トロンビンの終濃度が、 50μ g/m1になるように濃度が調製された、修飾77E203A205GトロンビンのPBS溶液を、 100μ 1ずつPRP1 30μ 1に添加し、惹起物質として5mg/m1リストセチン PBS溶液 35μ 1を添加した。コントロールとして、PRP1 30μ 1に、5mM リン酸緩衝液 0.15M NaCl、pH7.4 100μ 1を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図25に示す。

$[0\ 1\ 2\ 3\]$

評価 2 : 惹起物質として 1μ g /ml カルボキシル基修飾トロンビン PBS 溶液を用いた以外は、評価 1 の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、 PRP 130μ 1 に、 PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図 2 6 に示す。

以上の結果より修飾77E203A205Gトロンビンは化学修飾前に比較しAPTT延長効果の増強は確認されなかったが、修飾トロンビン惹起血小板凝集、リストセチン惹起血小板凝集抑制効果を示した。また、77のグルタミン酸への置換により置換前に比較し回収率の顕著な低下が確認された。

$[0 \ 1 \ 2 \ 4]$

(7) 203A205G77Eトロンビンのフィブリノゲン及びトロンボモジュリンへの結合特異性の確認

203A205Gトロンビン誘導体の0.1 mg/ml 10 mM リン酸バッファー(pH7.7)溶液、および203A205G77Eトロンビン誘導体の0.1 mg/ml 10 mM リン酸バッファー(pH7.7)溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25Cで撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS活性化CMデキストランキュベットに固定し、203A205Gトロンビン固定化キュベットおよび203A205G77Eトロンビン固

定化キュベットを得た。203A205Gキュベットには約4100arcの蛋白質が203A205G77Eキュベットには約2000arcの蛋白質が固相化された。引き続き1M エタノールアミン(pH8)を0.2m1加えブロッキング処理を行った。

さらに両キュベットを同様に洗浄、再生後、両キュベットに500nMの血液凝固第8因子溶液(50mM Tris塩酸 0.15M NaCl 10mM CaCl₂(pH7.4)に溶解)を 100μ 1加之たところ3分後203A205Gトロンビン固相化キュベットには約300arc secの血液凝固第8因子が吸着され、203A205G77Eトロンビン固相化キュベットには約300arc secの血液凝固第8因子が吸着された。

さらに両キュベットを $50\,\mathrm{mM}$ リン酸緩衝液、 $2\,\mathrm{M}$ NaCl、 $30\,\mathrm{mM}$ ベンズアミジン(pH7.4)で洗浄、再生後、 $203\,\mathrm{A}205\,\mathrm{G}$ トロンビン固定化キュベットおよび $203\,\mathrm{A}205\,\mathrm{G}$ 77Eトロンビン固定化キュベットそれぞれに、 $50\,\mathrm{nM}$ の可溶性トロンボモジュリン溶液(コスモバイオ)($50\,\mathrm{mM}$ リン酸緩衝液、 $0.15\,\mathrm{M}$ NaCl(pH7.4)に溶解)を $100\,\mathrm{\mu}$ 1 加えたところ、 $3\,\mathrm{G}$ 6 20 $3\,\mathrm{A}205\,\mathrm{G}$ 77Eトロンビン固相化キュベットには約 $100\,\mathrm{arc}$ secのトロンボモジュリンが吸着され、 $203\,\mathrm{A}205\,\mathrm{G}$ 77Eトロンビン固相化キュベットには約 $20\,\mathrm{arc}$ secのトロンボモジュリンが吸着された。

以上の結果より203A205Gトロンビン誘導体に新たにB鎖77リシンのグルタミン酸への 置換を加えることでキュベット上で血液凝固第8因子吸着に対してフィブリノゲン吸着量 は約3分の1に トロンボモジュリン吸着は約2分の1に低下している事がわかった。

また I A s y s F A S T F I T P R O G R A M (日製産業)による解析の結果 203 A 205 G に対するフィブリノゲン結合定数は 10.8 n M、血液凝固第 8 因子親和性は 5.07 n M、203 A 205 G 77 E に対するフィブリノゲン親和性は 190 n M、血液凝固第 8 因子親和性は 22.5 n M であった。

このB鎖779シンの置換によりフィブリノゲンに対するFVIII特異性の向上に起因し実験例13に記載の77E203A205Gトロンビン誘導体は203A205Gトロンビン誘導体に比較し高いAPTT延長能を有している事が予測された。

[0125]

[実験例14]

(1) B鎖203グリシンをアラニンにB鎖205セリンをアラニンにB鎖99アスバラギン酸をアスパラギンにB鎖77リシンをグルタミン酸に置換したトロンビン (77E203A205A99Nトロンビン) の発現

77E203A205A99NトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77E203A205A99Nトロンビン塩基配列を配列番号29に示す。

77E203A205A99Nトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77E203A205A99Nトロンビンが約3mg得られた。

$[0\ 1\ 2\ 6\]$

(2) 77E203A205A99Nトロンビン添加血液のAPTTの測定77E203A205A99Nトロンビン 50μ gをPBSに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。同様にPBSを、標準血漿(国際試薬社)に容量比1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは4:1秒であったのに対し、77E203A205A99NトロンビンのAPTTは3:9秒であった。以上より、77E203A205A99Nトロンビ

ンはヒルジンゲルへの結合能を有し且つ、活性が十分に低下し且つフィブリノゲン親和性を低下させる変異を加えてはているものも十分な抗APTT効果を有していないことがわかった。

$[0 \ 1 \ 2 \ 7]$

実験例15

B鎖203グリシンをアラニンに置換したトロンビン(203Aトロンビン)の発現

203AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。203Aトロンビン塩基配列を配列番号31に示す。

203Aトロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された203Aトロンビンが約2mg得られた。

203Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した。結果を図20に示す。FXIIIのA鎖は30分後においてすでに分解物が確認され3時間後には半量以上が分解を受けた。

さらに、203Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法(に従って測定した結果、3時間後クロットが形成された。

以上の結果より 203Aトロンビンは 非特許文献 5 において完全に活性を失った誘導体と報告されているものも、本発明における蛋白基質を用いた活性測定法においては、抗血栓剤として使用する目的においては明らかな蛋白基質分解活性が確認され抗血栓剤として使用することが困難であることが分かった。

[0128]

実験例16

(1)205セリンをグリシンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン (205G43Aトロンビン)の発現

205643AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205643Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号33に示す。

205643A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された205643A トロンビンが約0.5mg得られた。

 $[0\ 1\ 2\ 9\]$

(2) 205G43A トロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205643Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Aに従って測定した結果、インキュベーション後の吸光度の増加はみられなかった。

さらに、205643A トロンビンのトロンビン基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。205643A トロンビンはビルジン0 末端ペプチド結合性を有し且つ十分に活性を失っていることが分かった。205643A トロンビン 24μ g及び 12μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは43 秒であったのに対し、205643A トロンビンのAPTTはそれぞれ62 秒、55 秒であった。

以上の結果より、活性中心のセリン、ヒスチジンを同時に置換した205G43Aトロンビンは 低濃度においても化学修飾を行わずに高いAPTT延長効果を示すことがわかった。

[0130]

実験例17

(1) 205セリンをアラニンに43ヒスチジンをセリンに置換したトロンビン (205A43Sトロ

ンビン)の発現

205A43SトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205A43Sトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号35に示す。

205A43S トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された205A43S トロンビンが約3mg得られた。

$[0\ 1\ 3\ 1]$

(2) 205A43S トロンビンの基質分解活性測定

(1)で得られた205A43S トロンビンの基質分解活性を、前述の方法Bに従って測定した結果、FXIIIのA鎖活性化産物のバンドは確認されなかった。205A43S トロンビンはヒルジンC 末端ペプチド結合性を有し且つ十分に活性を失っていることが分かった。次に205A43S トロンビン 40μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは42秒であったのに対し、203A205SトロンビンのAPTTは72秒であった。

以上の結果より、活性中心のセリン、ヒスチジンを同時に置換した205A43S トロンビンは 化学修飾を行わずに高いAPTT延長効果を示すことがわかった。

[0132]

(3) 205A43Sトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

205A43Sトロンビン誘導体またはアンヒドロトロンビンの 約 $0.1 \, \mathrm{mg/ml}$ の $10 \, \mathrm{nM}$ リン酸緩衝液(pH7.4)溶液を、NHS活性化 $0 \, \mathrm{Mr}$ デストランキュベット(日製産業社)に添加し、 $10 \, \mathrm{O}$ 別間、 $25 \, \mathrm{C}$ で撹拌することにより、被験サンブル(トロンビン誘導体)をNHS活性化 $0 \, \mathrm{Mr}$ デキストランキュベットに固定し、 $205 \, \mathrm{A43S}$ トロンビンまたはアンヒドロトロンビン固定化キュベットを得た。約 $1200 \, \mathrm{arc}$ の $205 \, \mathrm{A43S}$ トロンビンがキュベットに固定化された。引き続き $1 \, \mathrm{M}$ エタノールアミン(pH8)を $0.2 \, \mathrm{ml}$ 加えブロッキング処理を行った。 $205 \, \mathrm{A43S}$ キュベットまたはアンヒドロトロンビンキュベットに $100 \, \mathrm{n}$ MのフィブリノゲンまたはFVIII を添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図 $1.7 \, \mathrm{cm}$ 可 $1.4 \, \mathrm{sm}$ アンヒドロトロンビンキュベットには $1.7 \, \mathrm{cm}$ 可 $1.7 \, \mathrm{sm}$ がのに対し、図 $1.7 \, \mathrm{sm}$ 205A43Sトロンビンキュベットには $1.7 \, \mathrm{sm}$ がの方がフィブリノゲンより多い結合が確認された。また固定化蛋白との対比を考えると少なくとも $1.7 \, \mathrm{sm}$ のに対し、図の方が205A43Sトロンビンはアンヒドロトロンビン同等の $1.7 \, \mathrm{sm}$ の対比を考えると少なくとも $1.7 \, \mathrm{sm}$ のが確認された。また固定化蛋白との対比を考えると少なくとも $1.7 \, \mathrm{sm}$ のがかった。横造変化を最小にするため単純に活性中心セリンをデヒドロアラニンに変換する事で得られたアンヒドロトロンビンに比較し、 $1.7 \, \mathrm{sm}$ のがかった。

[0133]

実験例18

(1)B鎖77リシンをグルタミン酸に205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン(77E205A43Aトロンビン)の発現

77E205A43A トロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77E205A43A トロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号37に示す。

77E205A43A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77E205A43A トロンビンが約3mg得られた。

$[0\ 1\ 3\ 4\]$

(2) 77E205A43A トロンビン 50μ g及び 25μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、

標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、77E205A43AトロンビンのAPTTはそれぞれ92秒、85秒であった。

[0135]

(3) PRPを用いた77E205A43A トロンビンの抗血小板機能の評価

評価 1 : 採血直後のクエン酸添加全血 $10\,\mathrm{ml}$ を、 $800\,\mathrm{rpm}$ で15分遠心し、上澄みよりPRP2 ml を得た。さらに $2800\,\mathrm{rpm}$ で10分遠心分離することによりPPPを得た。 $100\,\mu$ 1添加した場合に $77\,\mathrm{E}\,205\,\mathrm{A}\,43\,\mathrm{A}$ トロンビンの終濃度が、 $100\,\mu$ g/ $\mathrm{m}\,1$ になるように濃度が調製された、 $77\,\mathrm{E}\,205\,\mathrm{A}\,43\,\mathrm{A}$ トロンビンのPBS溶液を、 $100\,\mu$ 1ずつPRP $130\,\mu$ 1に添加し、惹起物質として $5\,\mathrm{m}\,\mathrm{g}/\mathrm{m}\,\mathrm{l}$ リストセチン PBS溶液 $35\,\mu$ 1を添加した。コントロールとして、PRP $130\,\mu$ 1に、 $5\,\mathrm{m}\,\mathrm{m}$ リン酸緩衝液 $0.15\,\mathrm{m}$ NaCl、 $\mathrm{pH}7.4$ $100\,\mu$ 1を添加し透過率の経時変化を記録したが、コントロールと同様の活性化曲線を示し、抑制作用は示さなかった。

$[0\ 1\ 3\ 6]$

評価 2 : 惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビン PBS 溶液を用いた以外は、評価 1 の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、 PRP 130μ 1 に、 PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図 2 7 に示す。

以上の結果より77E205A43A トロンビンは77リシンをグルタミン酸に変化させることでフィブリノゲン親和性を特異的に低下され、もともと活性中心のセリン及びヒスチジンの同時変異によりFVIII特異性が高まり強いAPTT抑制効果を持っていた205A43Aよりも、さらに強いAPTT抑制効果を示すことがわかった。また、77E205A43A トロンビンはリストセチン惹起血小板凝集抑制能は示さなかったが、修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制効果は示した。

$[0\ 1\ 3\ 7]$

(4)カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、lmg/5mlの77E205A43Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5) を<math>0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4 \mathbb{C} で 3 時間透析した後 1 -E thyl-3 -(3 -d imethylamino propyl) -c arbodi i mi de (和光純薬) を、その濃度が20mg/mlになるように添加し、2.5 \mathbb{C} にて0.5 時間 インキュベーションし、77E205A43A トロンビンのカルボキシル基を修飾した。可溶化状態で約40%の修飾体が回収された。

カルボキシル基修飾 77E205A43A トロンビン 50μ g及び 25μ g を、PBS 1 m 1 に溶解した溶液 100μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で 1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に 1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは 45 秒であったのに対し、カルボキシル基修飾 77E205A43AトロンビンのAPTTは 77E205A43AトロンビンのAPTTは 77E205A43Aトロンビ

[0138]

(5) PRPを用いたカルボキシル基修飾 77E 205A43A トロンビンの抗血小板機能の評価評価 1:採血直後のクエン酸添加全血 10m1 を、800 r pmで 15 分遠心し、上澄みより PRP 2m1 を得た。さらに 2800 r pmで 10 分遠心分離することにより PPP を得た。 100μ 1 添加した場合に修飾 77E 205 A43A トロンビンの終濃度が、 30μ g /m 1 になるように濃度が調製された、修飾 77E 205 A43A トロンビンの PBS 溶液を、 100μ 1 ずつ PRP 130μ 1 に添加し、惹起物質として 5mg/m1 リストセチン PBS 溶液 35μ 1 を添加した。コントロールとして、 PRP 130μ 1 に、 5mM リン酸緩衝液 15mM 15m

[0139]

評価2:惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用いた以外は、評価1の方法に準じて実験を行った。コントロールとして、PRP130 μ l に、PBS 100 μ l を添加し透過率の経時変化を記録した。修飾77E205A43Aトロンビンは結果を終濃度30 μ /mlにてカルボキシル基修飾トロンビン惹起血小板凝集を完全に抑制した。

以上の結果より77E205A43Aトロンビンは修飾によりAPTT延長能が増加した。又、修飾トロンビン惹起血小板凝集及びリストセチン惹起血小板凝集抑制効果も示した。しかしながら77E203A2056トロンビンのカルボキシル基修飾体同様に77E205A43Aトロンビンは修飾語の回収率はB鎖77のグルタミン酸への置換によって205A43Aトロンビンの修飾体に比較し大きく低下した。

[0140]

実験例19

(1) B鎖24 グルタミンをグルタミン酸に205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン(24E205A43Aトロンビン)の発現

24E205A43A トロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。24E205A43A トロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号 39 に示す。 24E205A43A トロンビンを実験例 1 の(1)の方法で発現した。実験例 1 の(2)の方法に準じてヒルジン C 末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画に若干のバンドが確認された。また、溶出ピークに大部分のトロンビンのバンドが確認された。引き続き実験例 1 の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジン C 末端ペプチドカラムによる精製を行った後、組み換えトロンビンを含有した溶出溶液を50 mM NaHCO3 pH8 で平衡化したHI TRAP ベンズアミジンカラム 5 mI(ファルマシア社) にアプライした。50 mM NaHCO3 0.3 M NaCI pH8にて充分洗浄した後 50 mM NaHCO3 0.3 N NaCI 0.3 NaCI

24E205A43A トロンビン 50μ gを、PBS 1m1に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1 の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは42秒であったのに対し、24E205A43AトロンビンのAPTTは62秒であった。

$[0 \ 1 \ 4 \ 1]$

(2) 24E205A43Aトロンビン及びアンヒドロトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性の比較

24E205A43Aトロンビン誘導体又はアンヒドロトロンビンを約0.1 mg/ml含む 10 mM リン酸緩衝液(pH7.4)溶液を、それぞれNHS活性化CMデキストランキュベット(日製産業社)に添加し、10分間、25 $\mathbb C$ で撹拌することにより、被験サンプル(トロンビン誘導体)をNHS 活性化CM デキストランキュベットに固定し、24E205A43Aトロンビン及びアンヒドロトロンビン固定化キュベットを得た。(それぞれ1380 arc, 2400 arc 固相化)引き続き 1 M エタノールアミン(pH8)を0.2 ml加えブロッキング処理を行った。

24E205A43Aトロンビンキュベット及びアンヒドロトロンビンキュベットにそれぞれ100nMのフィブリノゲン及びFVIIIを添加しそれぞれの結合曲線をモニターした。結果を図18 および図14に示す。

図 18 より 24 E 20 5 A4 3 A トロンビンキュベットには F V III の方がフィブリノゲンより多くの結合が確認された。 24 E 20 5 A4 3 A は高い F V III 特異性を有している事が確認された。

[0142]

(3) 205A43Aトロンビン及び24E205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン親和性の比較 205A43Aトロンビン及び24E205A43Aトロンビン固定化キュベットに対し16.7nM ついで50n Mのトロンボモジュリンを加えた。

結合曲線を図19に示す。尚 205A43Aトロンビンは約980arc, 24E205A43Aトロンビンは約1380arcのトロンビン誘導体が固定化されている。

以上の結果より24E205A43Aトロンビンはフィブリノゲンに対しFVIII特異性が高い誘導体でありAPTT延長効果も有していた。さらにはトロンボモジュリン結合能も大きく低下していることより生態に投与した際、本トロンビン変異体が生体内でのトロンビンによるプロティン(活性化を抑制(阻害)することは無いと考えられる。

[0143]

実験例20

205セリンをアラニンに99アスパラギン酸をアラニンに置換したトロンビン (205A99Aトロンビン) の発現

205A99AトロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。205A99Aトロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号41に示す。

205A99A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法にエカリンによる活性化を行ったところ、エカリンによるA、B鎖への切断が起こらなかった

この結果より205A99Aトロンビンをプレトロンビンの形でCHO細胞にて発現した本実験においては2本鎖に活性化された205A99Aトロンビンを得ることはできなかった。

$[0\ 1\ 4\ 4\]$

[実験例21]

カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビン及びカルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43AトロンビンのAPTTの比較

PBSに溶解した 50μ g/mlのカルボキシル基修飾アンヒドロトロンビン、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43Aトロンビンを以下の2 方法でAPTTを測定した。コントロールとしてPBSのみを添加して下記方法a, b にてAPTTを測定した。尚 カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンは残存活性の影響を極力防ぐために合成後、再度APMSF試薬(シグマ社)を2 mg/ml添加し不活性化を行い、さらにその後PBSにて十分透析を行い残存APMSF試薬の除去を行った。

[0145]

方法 b :標準血漿 $1 \ 0 \ 0 \ \mu \ 1$ PBSに溶解した各サンプル $1 \ 0 \ 0 \ \mu \ 1$ 及びAPTT試薬 $5 \ 0 \ \mu \ 1$ を加え $3 \ 7$ ℃で 5 分インキュベーションを行った後 $0 \ \cdot \ 1$ M $0 \ a \ 0 \ 1$ を $1 \ 2 \ \mu \ 1$ 加えカルシウム添加から凝固までの時間を測定した。

[0146]

結果を以下に示す。

コントロール方法 a43秒;方法 b45秒カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン方法 a105秒;方法 b66秒カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン方法 a75秒;方法 b80秒205A43Aトロンビン方法 a67秒;方法 b77秒

カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン 方法a 145秒; 方法b 170秒

$[0\ 1\ 4\ 7\]$

以上より、カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンにおいては方法aにて良くAPTTを延長したのに対しカルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43Aトロンビンにおいては方法bにて良くAPTTが延長された。またカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンは205A43Aトロンビンよりも同一条件においてAPTT延長効果は高かった。

方法aは標準血漿と各トロンビン誘導体混合物のインキュベーション時間が無いのに対し方法bは標準血漿と各トロンビン誘導体混合物が37℃で5分インキュベーションされる。カルボキシル基修飾アンヒドロトロンビンにおいて方法bでAPTT延長効果が少なくなった理由としてアンヒドロトロンビンから化学的に合成されるアンヒドロトロンビンにおいて極微量に残存するトロンビンの存在を完全に否定できず極わずかなトロンビンが標準血漿と37℃インキュベーションすることで微量の血液凝固因子(特にFVIII)活性化が起き、APTT延長効果を抑制したものと考えられた。一方、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン、205A43Aトロンビンにおいては遺伝子組み換え技術によって完全に活性を失っているトロンビン誘導体であり、標準血漿とインキュベーションした場合においても血液凝固因子の活性化は起きず、むしろインキュベーションを行った場合の方が平衡化され基質特異性が良く反映され顕著にAPTTを延長した。

以上の考察より、抗血栓剤としてトロンビン誘導体及びそのカルボキシル基修飾誘導体を用いる場合には極微量のトロンビンの混入が考えられるアンヒドロトロンビンを用いるよりも、遺伝子工学的に完全に不活性化され且つ均一な組み換え誘導体から選ばれる適切な薬効を有した本発明で得られる遺伝子組み換えトロンビン及びそのカルボキシキル基修飾誘導体の方が安全であり、かつ37℃で少なくとも数時間は存在するvivoでは薬効も高いことが予想される事が示された。

[0148]

実験例22

(1)B鎖77リシンをアラニンに205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン(77A205A43Aトロンビン)の発現

77A205A43A トロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。77A205A43A トロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号43に示す。

77A205A43A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC 末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC 末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された77A205A43A トロンビンが約3mg得られた。

$[0 \ 1 \ 4 \ 9]$

(2) 77A205A43A トロンビン 50μ g及び 25μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは45秒であったのに対し、77A205A43AトロンビンのAPTTはそれぞれ90.5秒、85秒であった。

[0150]

(3)カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、lmg/5mlの77A205A43Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5)を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5)に4℃で3時間透析した後 <math>l-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide(和光純薬)を、その濃度が<math>20mg/mlになるように添加し、25℃にて l 時間インキュベーションし、77A205A43A トロンビンのカルボキシル基を修飾した。可溶化状態で約85%の修飾体が回収された。

カルボキシル基修飾 77A205A43A トロンビン 50μ g及び 25μ g を、PBS 1 m 1 に溶解した溶液 100μ 1 を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で 1 : 1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に 1 : 1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは 45 秒であったのに対し、カルボキシル基修飾 77A205A43A トロンビンのAPTTは 77A205A43A トロンビンの 77A205A43A トロンビンの 77A205A43A トロンビ

$[0\ 1\ 5\ 1]$

(4)プロトロンビン時間(PT)の測定

77A205A43Aトロンビン及びカルボキシル基修飾77A205A43Aトロンビン 50μ gを、PBS1m1に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHR OMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは23秒であったのに対し77A205A43Aトロンビンは24秒、カルボキシル基修飾77A205A43AトロンビンのPTは25秒でありいずれもPTの延長効果は示さなかった。

以上の結果よりB鎖77リシンをアラニンに置換することで置換前に比較しAPTT延長効果が高まった。又、修飾体においても77リジンをアラニンに置換することでAPTT延長効果が増強された。又、B鎖77をグルタミン酸に置換した場合に比べ修飾した場合の回収率の大きな低下は認められなかったことよりB鎖77における修飾の適性はアラニンの方が高

い事が示された。

[0152]

実験例23

(1)B鎖65リシンをアラニンに205セリンをアラニンに43ヒスチジンをアラニンに置換したトロンビン(65A205A43Aトロンビン)の発現

65A205A43A トロンビンのDNAに相当する変異導入プライマーを用いたPCR法にて合成した。65A205A43A トロンビンをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号45に示す。

65A205A43A トロンビンを実験例1の(1)の方法で発現した。実験例1の(2)の方法に準じてヒルジンC 末端ペプチド結合性を確認したところ、素通り分画にはバンドは確認されず、溶出ピークにトロンビン同様のバンドが確認された。引き続き実験例1の(3)の方法に準じ、硫酸化セルロファイン、ヒルジンC 末端ペプチドカラムによる精製を行った。SDS-PAGE上ほぼ純化された65A205A43A トロンビンが約3mg得られた。

[0153]

(2) 65A205A43A トロンビン 50μ g及び 25μ gを、PBS lmlに溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)に容量比で1:1の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1の割合となるように添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは42秒であったのに対し、65A205A43AトロンビンのAPTTはそれぞれ93秒、86秒であった。

$[0\ 1\ 5\ 4\]$

(3)カルボキシル基修飾体のAPTT試験

さらに、lmg/5mlの65A205A43Aトロンビン 0.5M NaCl (pH6.5) を0.25M グリシンエチルエステル 0.5M NaCl (pH6.5) に4Cで3時間透析した後 l-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (和光純薬)を、その濃度が<math>20mg/mlになるように添加し、2.5 ℃にて1 時間インキュベーションし、65A205A43A トロンビンのカルボキシル基を修飾した。

カルボキシル基修飾 65A205A43A トロンビン 50μ g、 25μ gを、PBS 1m1 に溶解した溶液 100μ 1を、標準血漿(国際試薬社)に容量比で 1:1 の割合となるように添加し、APTTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に 1:1 で添加したものをコントロールとし、APTTを測定した。なお、APTT試薬には国際試薬社のものを使用した。その結果、コントロールのAPTTは 41 秒であったのに対し、カルボキシル基修飾 65A205A43A トロンビンの APTTは 2π 0 それ 2π 1 を 2π 1 を 2π 2 の 2π 3 を 2π 3 を 2π 4 を 2π 3 を 2π 4 を 2π 4 を 2π 4 に溶解した。 2π 4 を 2π 4 を

[0155]

(4)プロトロンビン時間(PT)の測定

65A205A43Aトロンビン及びカルボキシル基修飾65A205A43Aトロンビン 50μ gを、PBS1m1に溶解したものを、標準血漿(国際試薬社)にそれぞれ容量比で1:1の割合となるように添加し、PTを測定した。PBSを、標準血漿(国際試薬社)に1:1(容量比)となるように添加したものをコントロールとし、PTを測定した。なお、PT試薬にはSIGMA社のTHR OMBOPLASTIN WITH CALSIUMを使用した。その結果、コントロールのPTは23秒であったのに対し65A205A43Aトロンビンは22秒、カルボキシル基修飾65A205A43AトロンビンのPTは25秒でありいずれもPTの延長効果は殆ど示さなかった。

$[0\ 1\ 5\ 6\]$

(5) PRPを用いた65A205A43Aトロンビンの抗血小板機能の評価

[0157]

評価 2 : 惹起物質として 1μ g /ml カルボキシル基修飾トロンビン PBS 溶液を用い 65A205A43 Aトロンビンの終濃度が、 100, 50, 25, 10μ g /m 1 になるように添加した以外は、評価 1 の方法に準じて実験を行った。 コントロールとして、 PRP 130μ 1 に、 PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。 結果を図 29、 30、 31 に示す。

評価3:惹起物質として 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンPBS溶液を用い100 μ l添加した場合に修飾65A205A43Aトロンビンの終濃度が、それぞれ $36,18,9,4.5\mu$ g/mlになるように濃度が調製された、修飾65A205A43AトロンビンのPBS溶液を加え、評価1の方法に準じて実験を行った。結果を図 32、33、34 に示す。

評価 4 :修飾 65A205A43Aトロンビンの終濃度が、 36μ g / m 1 になるように濃度が調製された、修飾 65A205A43Aトロンビンの PBS 溶液を、 100μ 1 ずつ PRP1 30μ 1 に添加し、惹起物質として 5 m g / m 1 リストセチン PBS 溶液 35μ 1 を添加した。コントロールとして、PRP1 30μ 1 に、PBS 100μ 1 を添加し透過率の経時変化を記録した。結果を図 35 に示す.

[0158]

以上の結果より65A205A43Aは205A43Aに比較して高いAPTT延長効果を有し且つより低濃度で強い修飾トロンビン惹起血小板凝集抑制効果を示した。

$[0\ 1\ 5\ 9\]$

(6) 65A205A43Aトロンビン及び205A43Aトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合 特異性の比較

[0160]

(7) 205A43Aトロンビン及び65A205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン親和性の比較65A205A43Aトロンビン固定化キュベットに対し16.7nM、ついで50nMのトロンボモジュリンを加えた。

結合曲線を図37に示す。尚、65A205A43Aトロンビンは約1800arc固定化されている。

以上の結果より図19記載の205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン結合能と比較した場合、固定化蛋白量の相対的な比率で換算すると65A205A43Aは約30%にトロンボモジュリン結合能が低下していた。トロンボモジュリン結合能が低下していることより生態に投与した際、65A205A43Aトロンビン変異体が生体内でのトロンビンによるプロテイン(活性化の抑制(阻害)が低下していると考えられる。

【産業上の利用可能性】

$[0\ 1\ 6\ 1\]$

本発明のトロンビン誘導体は、抗血栓剤、抗炎症剤などの医薬として好適に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

[0162]

【図1】 5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾203A205Gトロンビン($37 \mu\text{ g/ml}$)の抗血小板効果を示す図。009がコントロールを、010がカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを示す。縦軸が透過率(%)、横軸が時間(分)を示す(図2-12、15,21-22、25-35も同じ)。

【図2】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾 203A2056トロンビン(37μ g/m 1)の抗血小板効果を示す

- 図。002がコントロールを、001がカルボキシル基修飾203A205Gトロンビンを示す。
- 【図3】 5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、205A43Aトロンビン($30 \mu \text{ g/ml}$)の抗血小板効果を示す図。079がコントロールを、080が205A43Aトロンビンを示す。
- 【図4】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、205A43Aトロンビン(30μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。083がコントロールを、084が205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 5 】 5 m g/m l リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン(30 μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。056がコントロールを、055がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 6 】 5 m g/m l リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン($15 \mu \text{ g/m l}$)の抗血小板効果を示す図。042がコントロールを、041がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。
- 【図7】 5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205A43Aトロンビン($7.5 \mu\text{ g/ml}$)の抗血小板効果を示す図。058がコントロールを、057がカルボキシル基修飾205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 8】 1μ g/mlカルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾 205A43Aトロンビン(30 μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。064がコントロールを、063がカルボキシル基修飾 205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 9】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾 205 A 43 Aトロンビン(15μ g/m 1)の抗血小板効果を示す図。067 がコントロールを、066 がカルボキシル基修飾 205 A 43 Aトロンビンを示す。
- 【図 1 0】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、カルボキシル基修飾 205A43Aトロンビン(7.5μ g/m 1)の抗血小板効果を示す図。070がコントロールを、069がカルボキシル基修飾 205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 1 1】 5 mg/m l リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、203A2 05Gトロンビン(80 μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。104がコントロールを、095が2 03A205Gトロンビンを示す。
- 【図 1 3 】 203A205Gトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が 1.0×10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が 1.0×10^{-7} MのFVIIIを示す。
- 【図 1 4 】 アンヒドロトロンビンのフィブリノゲン及び VIII への結合特異性を示す図。破線が 1.0×10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が 1.0×10^{-7} Mの FVIII を示す。
- 【図 1 5 】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した P R P に対する、205A43Aトロンビン(007; 3.26μ M、008; 0.81μ M)の抗血小板効果を示す図。009がコントロールを示す。
- 【図 1 6 】 205A43Aトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が 1.0×10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が 1.0×10^{-7} MのFVIIIを示す。
- 【図 1 7 】 205A43Sトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が 1.0×10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が 1.0×10^{-7} MのFVIIIを示す。
- 【図 1 8 】 24E205A43Aトロンビンのフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が 1.0×10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が 1.0×10^{-7} MのFVIIIを示す。
- 【図 1 9】 205A43Aトロンビン及び24E205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン親和性を示す図。Dが205A43Aトロンビン、Eが24E205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 2 0 】 203Aトロンビンのトロンビン基質分解活性を示す電気泳動の図(写真)。 1 は分子量マーカー、 2 , 5 は空のレーン、 3 はFXIIIのみ、 4 はFXIII+ 203Aトロンビンを示す。また、レーン 6 ~ 1 0 はFXIIIに 203Aトロンビンを加えてそれぞれ 0, 0. 5 , 1, 3, 6時間反応させたものを示す。

- 【図 2 1】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した PRPに対する、カルボキシル基修飾 205Aトロンビン(100μ g/m 1)の抗血小板効果を示す図。016 がコントロールを、015 が 203A205 6 トロンビンを示す。
- 【図 2 2 】 5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾205Aトロンビン($100 \mu \text{ g/ml}$)の抗血小板効果を示す図。003がコントロールを、004がカルボキシル基修飾205Aトロンビンを示す。
- 【図 2 3 】 205Aトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が 1.0×10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が 1.0×10^{-7} MのFVIIIを示す。
- 【図 2 4 】 205A203Aトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が 1.0×10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が 1.0×10^{-7} MのFVIIIを示す。
- 【図 2 5 】 5 m g/m l リストセチンで血小板凝集を惹起した PRP に対する、カルボキシル基修飾 77E203A205Gトロンビン($50 \mu \text{ g/m l}$)の抗血小板効果を示す図。001がコントロールを、002がカルボキシル基修飾 77E203A205Gトロンビンを示す。
- 【図 2 6 】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した PRPに対する、カルボキシル基修飾 77E203A205Gトロンビン(50μ g/m 1)の抗血小板効果を示す図。014がコントロールを、013がカルボキシル基修飾 77E203A205Gトロンビンを示す。
- 【図 2 7】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した PRPに対する、77E205A43Aトロンビン(100μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。019がコントロールを、020が 77E205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 2 8 】 5 mg/ml リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾 77E205A43Aトロンビン($30\,\mu\text{g/ml}$)の抗血小板効果を示す図。 $005\,\text{m}$ コントロールを、 $006\,\text{m}$ カルボキシル基修飾 77E205A43Aトロンビンを示す。
- 【図 2 9】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、65A205A43Aトロンビン(100μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。020がコントロールを、019が65A205A43Aトロンビンを示す。
- 【図30】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、65A205A43Aトロンビン(25または 50μ g/m 1)の抗血小板効果を示す図。021が 25μ g/m 1を、022が 50μ g/m 1を示す。
- 【図31】 1μ g/m1カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、65A205A43Aトロンビン(10μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。023がコントロールを、024が65A205A43Aを示す。
- 【図32】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾65A205A43Aトロンビン(36μ g/m1)の抗血小板効果を示す図。038がコントロールを、033がカルボキシル基修飾65A205A43Aトロンビンを示す。
- 【図33】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾 65A205A43Aトロンビン(9又は 18μ g/m 1)の抗血小板効果を示す図。 035 が 18μ g/m 1を、 036 が 9μ g/m 1を示す。
- 【図34】 1μ g/m 1 カルボキシル基修飾トロンビンで血小板凝集を惹起した PRPに対する、カルボキシル基修飾 65A205A43Aトロンビン(4.5μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。
- 【図35】5 m g/m l リストセチンで血小板凝集を惹起したPRPに対する、カルボキシル基修飾65A205A43Aトロンビン(36μ g/ml)の抗血小板効果を示す図。041がコントロールを、042がカルボキシル基修飾77E205A43Aトロンビンを示す。
- 【図36】65A205A43Aトロンビン誘導体のフィブリノゲン及びFVIIIへの結合特異性を示す図。破線が 1.0×10^{-7} Mのフィブリノゲン、実線が 1.0×10^{-7} MのFVIIIを示す。
- 【図37】65A205A43Aトロンビンのトロンボモジュリン親和性を示す図。

SEQUENCE LISTING

```
<110> Chisso Corporation
       FUJIMORI KOGYO Co., Ltd.
〈120〉 トロンビン誘導体、およびそれを含有する医薬組成物
\langle 130 \rangle P - 050037
<150> JP 2004-080950
<151> 2004-03-19
<150> JP 2004-170346
<151> 2004-06-08
<150> JP 2004-217834
<151> 2004-07-26
<150> JP 2004-315631
\langle 151 \rangle 2004-10-29
< 1.6.0 > 4.6
\langle 170 \rangle PatentIn version 3.1
< 2 1 0 > 1
<211> 927
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
<222> (1).. (927)
< 2 2 3 >
<400>
acc gcc acc agt gag tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc
Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly
                5
                                   1.0
tcg gga gag gca gac tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg
                                                                       96
Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser
            2 0
                                2.5
                                                     3.0
ctg gag gac aaa acc gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg
                                                                      144
Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly
        3.5
                            4 0
                                                4.5
cgc att gtg gag ggc tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag
                                                                      192
Arg Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln
                        5 5
                                            6.0
```

gtg atg ctt ttc cgg aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc

2 4 0

V a 1	Met	L e u	P h e	Arg	L y s 7 0	Ser	Pro	Gln	Glu	L e u 7 5	Leu	Суѕ	G 1 y	Ala	S e r 8 0	
ctc	a t c	a g t	gac	свс	tgg	gtc	ctc	асс	gcc	gcc	сас	t g c	ctc	ctg	t a c	288
Leu											His					
Б≎ч	110	501	пор	85	110	,	Бой	1 11 1	9 0	71 I W	1115	0,5	ьоч	95	1 , 1	
C C 0	C C C	tσσ	gar		220	t t c	200	σασ		gar	ctt	ctσ	a t a	cgc	a t t	3 3 6
													Val		_	000
110	110	111	100	ГЪЗ	W 2 II	1 11 6	1 11 1	105	W 2 II	A 2 h	Leu	ьеи	110	Arg	I I e	
ggc	aag	cac		C g C	аса	agg	tac		C g a	аас	a t t	gaa	aag	a t a	tcc	3 8 4
	-										I I e			I l e		001
013	ц	115	501	111 6	1 11 1	11 1 5	120	oru	111 6	11 5 11	110	125	ц	110	DVI	
a t g	ttσ		2 2 0	a t c	tac	a t c		000	200	tac	226	tgg	Сдд	gag	226	4 3 2
											Asn					102
MET	130	Ulu	Гјз	115	1) 1	135	11 1 2	110	ЛІБ	1) 1	140	111	ЛІБ	Ulu	V 2 II	
c t a	gac	c a a	a a c	a t t	a c c		n t a	2 2 6	e t a	2 2 6		c c t	a t t	a c c	t t c	480
-	-										aag					400
Leu	ASP	АГВ	ASP	1 1 e		Lеи	wet	ГЯЗ	Lеи		Lys	110	val	AIa		
1 4 5		4	- 4 4		150	4	1 1	. 4		155					160	r 0 0
-											agg			-	gcc	5 2 8
S e r	Asp	lyr	Пе		Pro	V a I	Суѕ	Leu		Asp	Arg	Glu	lhr	Ala	Ala	
				165					170					175		
											a c a		t g g		a a c	5 7 6
Ser	Leu	Leu		Ala	Gly	Туr	Lуs		Arg	V a l	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	
			180					185					190			
ctg	a a g	gag	a c g	t g g	a c a	gcc	аас	g t t	g g t	a a g	ggg	cag	$C \; C \; C$	a g t	g t c	6 2 4
Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	Thr	Ala	Asn	V a l	Gly	Lys	G 1 y	Gln	P r 0	Ser	V a l	
		195					200					205				
ctg	cag	g t g	gtg	аас	c t g	$c \; c \; c$	a t t	g t g	gag	Сдд	ссв	g t c	t g c	a a g	gac	6 7 2
Leu	Gln	Val	Val	Asn	Leu	Pro	Пе	Val	Glu	Arg	Pro	V a l	Суѕ	Lys	Asp	
	2 1 0					2 1 5					2 2 0					
$t \circ c$	асс	Сдд	a t c	C g C	a t c	a c t	gac	аас	a t g	t t c	t g t	gct	g g t	t a c	aag	7 2 0
Ser	Thr	Arg	Пlе	Arg	Пlе	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Суѕ	Ala	Gly	Туr	Lys	
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	
	gat	gaa	ggg	a a a	сва	ggg	gat	gcc	t g t	gaa	g g t	gac	a g t	ggg	gga	768
											Gly			Gly		
				2 4 5					250					255		
0.0.0	t t t	gtc	a t g		agc	ССС	t t t	аас		CgC	t g g	tat	саа		ggc	8 1 6
											Trp					0.1
110	1 11 0		260	טנם	501	110	1 11 0	265	71 5 11	1110	11 p	. , .	270	111 O C	01,	
a t c	gtc	t c a		σσt	σαα	σσε	tσt		c o o	σat	ggg	2 2 2		ggc	t t c	8 6 4
	Val										Gly					0 0 1
115	ral	275	1 1 P	UIJ	viu	OIJ	280	w o h	игв	us h	OIJ	285	1) 1	OIJ	тис	
t a a	900		a + a	+ + ^	e a e	c t a		99"	+ = =	a t a	C 0 "		a t o	2 + +	n a +	A 1 O
											cag					9 1 2
Туr		ПΙЗ	v a I	гпе	A L B		ГЯЗ	ГЯЗ	111	116	Gln	гуѕ	v a I	116	A 2 D	
	290			1 -		295					3 0 0					0.05
cag			gag	ιag												9 2 7
	Phe	P	6 I U													
3 0 5																

```
< 4 0 0 >
Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly
               5
                                  1 0
Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser
                               25
Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly
       35
                           4 0
                                               4.5
Arg Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln
                       5.5
Val Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser
6.5
                   7.0
                                      7 5
                                                           8.0
Leu Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr
               8 5
                                   9.0
Pro Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile
                   1 0 5
           1 0 0
                                       1 1 0
Gly Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser
                                 1 2 5
       115
                           1 2 0
Met Leu Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn
               1 3 5
Leu Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe
                       155
     1 5 0
Ser Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala
               165
                                  170
Ser Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn
           180
                               185
                                                   190
Leu Lys Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val
                           200
Leu Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp
                       2 1 5
   2 1 0
                                           2 2 0
Ser Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys
                   2 3 0
                                       235
Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly
                     250
               2 4 5
Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly
           260
                               265
lle Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe
                                    285
       275
                           280
Tyr Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp
   290
                      295
                                           3 0 0
Gln Phe Gly Glu
3 0 5
< 2 1 0 >
< 2 1 1 >
     1.0
< 2 1 2 >
     PRT
```

<212>

< 2 1 3 >

< 2 1 3 >

Homo sapiens

PRT

Homo sapiens

```
< 4 0 0 > 3
Gly Asp Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu
                 5
< 2 1 0 > 4
\langle 211 \rangle = 73
\langle 2 1 2 \rangle PRT
<213> Homo sapiens
< 4 0 0 > 4
Arg Arg Pro Glu Ser Lys Ala Thr Asn Ala Thr Leu Asp Pro Arg Ser
Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp
             2.0
                                  25
                                                        3 0
Glu Glu Lys Asn Glu Ser Gly Leu Thr Glu Tyr Arg Leu Val Ser Ile
                              4 0
Asn Lys Ser Ser Pro Leu Gln Lys Gln Leu Pro Ala Phe Ile Ser Glu
    5 0
                         5 5
                                               6.0
Asp Ala Ser Gly Tyr Leu Thr Ser Ser
6.5
                     7.0
<210> 5
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
       CDS
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
< 2 2 3 >
< 4 0 0 >
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                           4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                 5
                                     1 0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                           96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
             2.0
                                  25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                          144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                              4 0
                                                   4 5
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                          192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                     5 5
                                               6 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                          2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                     7.0
                                           7.5
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                          288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
```

				8 5					9 0					9 5		
t c g	gat	g C A	gyg		a a c	a f g	t c a	cct	t g g	Cag	g f g	a t g	ctt		Caa	3 3 6
									Trp							
			100					105					110	•	0	
aag	a g t	ССС		gag	ctg	ctg	t g t		gcc	agc	ctc	a t c		gac	свс	3 8 4
									Ala							
		115					120					125				
t g g	gtc	c t c	асс	gcc	gcc	сас	t g c	$c\ t\ c$	c t g	t a c	ссв	$C \; C \; C$	t g g	gac	aag	4 3 2
Trp	V a l	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Сус	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	
	130					135					1 4 0					
a a c	t t c	асс	gag	a a t	g a c	c t t	c t g	g t g	c g c	a t t	ggC	a a g	сас	t c c	c g c	4 8 0
	P h e	Thr	Glu	Asn		Leu	Leu	V a l	Arg		Gly	Lys	His	Ser		
l 4 5					150					155					160	5.0.0
									a t a							5 2 8
lhr	Arg	lyr	6 I u		Asn	I I e	6 I u	Lуs	IIe	Ser	Met	Leu	Glu		He	
t o o	0 + 0	0.00	0.00	165	+ 0 0	0.00	+	0 0 0	170	0.00	0 + 4		0	175	0 + +	E 7 £
									gag Glu							5 7 6
1 9 1	116	11 1 2	180	AIg	1) 1	W 2 II	Пр	185	υıu	A 2 II	Leu	A 5 p	190	A S P	116	
gcc	ctø	a t ø		c t g	аая	аав	cct		gcc	ttc	a g t	gac		a t t	сас	6 2 4
									Ala							V 2 1
	2 0 4	195	2,5	2 • •	2,,	2,5	200			0	~ • •	205	. , .			
c c t	gtg		ctg	ССС	gac	agg		a c g	g c a	gcc	a g c		ctc	сав	gct	6 7 2
									Ala							
	2 1 0					2 1 5					2 2 0					
gga	t a ε	aag	ggg	Сдд	g t g	аса	ggc	t g g	ggc	аас	\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{g}	a a g	gag	a c g	t g g	7 2 0
Gly	Туr	Lys	Gly	Arg	V a l	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	
									a g t							7 6 8
Thr	Ala	Asn	V a l		Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	V a l	Leu	Gln	Val		Asn	
				2 4 5					250					255		0.1.0
									aag							8 1 6
Leu	110	1 1 e	v a 1 2 6 0	6 I U	Arg	110	vai	265	Lys	ASP	ser	I II r	Arg 270	1 1 e	Arg	
a t c	a c t	a a c		a t o	ttc	t a t	a c t		t a c	2 2 0	cct	σa t		0 0 0	2 2 2	8 6 4
									Tyr							0 0 1
110	1 11 1	275	11 5 11	m o t	1 11 0	0,5	280	01,	. , .	Б,5	110	285	oru	01,	Б 3 3	
сва	ggg		gcc	t g t	gaa	ggt		a g t	ggg	gga	ССС		gtc	a t g	aag	9 1 2
									Gly							
	290					295					3 0 0					
a g c	ССС	t t t	аас	аас	Свс	t g g	t a t	саа	a t g	g g C	a t c	g t c	$t\ c\ a$	t g g	g g t	960
Ser	Pro	P h e	Asn	Asn	Arg	Trp	Туr	Gln	Met	Gly	Пlе	V a l	Ser	Trp	Gly	
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
									g g C							1 0 0 8
Glu	Gly	Суѕ	Asp		Asp	G 1 y	Lуs	Туr	Gly	P h e	Туr	Thr	His		P h e	
	. 4			3 2 5	. 4			4	3 3 0					3 3 5	4 -	1 A F C
									a t t						t a g	1 0 5 6
Alg	Leu	LУS	Lys 340	1 []	1 1 e	υIN	LУS	v a 1 3 4 5	II e	ASD	υIN	гпе	350	ъIU		
			0 4 V					040					000			

```
< 2 1 2 >
      PRT
< 213>
      Homo sapiens
< 4 0 0 > 6
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                                     1.0
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            2.0
                                 25
                                                      3.0
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                             4 0
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5 0
                         5 5
                                              6.0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                    7.0
                                         7.5
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                85
                                     90
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
           1 \ 0 \ 0
                                 105
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu lle Ser Asp Arg
                            1 2 0
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                        135
                                             1 4 0
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
              150
                                         155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                                     170
                165
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                                 185
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
        195
                             200
                                                  205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                        2 1 5
                                              2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225
        2 3 0
                                        235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                 265
                                                      2 7 0
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
                             280
                                                  285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                        295
    290
                                              3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
3 0 5
                    3 1 0
                                         3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                3 2 5
                                     3 3 0
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
                                                      350
```

< 2 1 0 > < 2 1 1 >

351

```
< 2 1 0 > 7
<211> 1056
< 2 1 2 > DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
< 2 2 2 >
     (1)...(1056)
< 2 2 3 >
<400> 7
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                    4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
               5
                          1 0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                     96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                               25
            2 0
                                                   3.0
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                    1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        3.5
                           4 0
                                               4.5
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                    192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                       5 5
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                    2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
6 5 7 0 7 5
                                                                    288
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
               8.5
                                   9.0
                                                                    3 3 6
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
                     105
        100
                                              1 1 0
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
                                                                    384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
       1 1 5
                   1 2 0
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                    4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
   1 3 0
                       1 3 5
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc
                                                                    480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                       155
       150
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc
                                                                    528
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                     170
               165
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att
                                                                    5 7 6
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                               185
           180
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac
                                                                    6 2 4
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
```

195			2 0 0			2 0 5		
cct gtg tgt	ctg ccc	gac agg		g c a g	cc agc		cag gct	672
Pro Val Cys								
2 1 0		2 1 5			2 2 0			
gga tac aag	ggg cgg	gtg aca	ggc tgg	g g c a	ac ctg	aag gag	acg tgg	7 2 0
Gly Tyr Lys	Gly Arg	Val Thr	Gly Trp	Gly A	sn Leu	Lys Glu	Thr Trp	
2 2 5		2 3 0		2	3 5		2 4 0	
aca gcc aac	gtt ggt	aag ggg	cag ccc	agt g	tc ctg	cag gtg	gtg aac	7 6 8
Thr Ala Asn		Lys Gly	Gln Pro		al Leu	Gln Val	Val Asn	
	2 4 5			2 5 0			2 5 5	
ctg ccc att							atc cgc	8 1 6
Leu Pro Ile		Arg Pro			sp Ser		lle Arg	
	260	+ + 0 + 4 +	265		0 m 0 0 t	270		0 £ 1
atc act gac Ile Thr Asp								864
275	V211 MCf	ine cys	280	IJI L	32 110	285	OIY LYS	
	ecc tet	gaa gct		9999	ga ccc		atg aag	9 1 2
		Glu Ala						0 1 2
290		295	,	• • • •	3 0 0		• • • • • • • • • • • • • • • • • •	
agc ccc ttt	aac aac	cgc tgg	tat caa	atg g	gc atc	gtc tca	tgg ggt	960
Ser Pro Phe	Asn Asn	Arg Trp	Tyr Gln	Met G	ly Ile	Val Ser	Trp Gly	
3 0 5		3 1 0		3	15		3 2 0	
gaa ggc tgt	gac cgg	gat ggg	aaa tat	ggc t	tc tac	aca cat	gtg ttc	1008
Glu Gly Cys		Asp Gly	Lys Tyr		he Tyr	Thr His	Val Phe	
	3 2 5			3 3 0			3 3 5	
cgc ctg aag						ttt gga		1 0 5 6
Arg Leu Lys		lle GIn			.sp GIn		Glu	
	3 4 0		3 4 5			3 5 0		
< 2 1 0 > 8								
<211> 351								
< 2 1 2 > PRT								
< 2 1 3 > Homo	s a p i e n s							
< 4 0 0 > 8								
Met Ala His		Gly Leu	Gln Leu	Pro G	ly Cys	Leu Ala	Leu Ala	
1	5							
	α .	17 1 11 1	0 01	10			15	
Ala Leu Cys		Val His			al Phe			
	2 0		2 5	His V		3 0	Pro Gln	
Gln Ala Arg	2 0		25 Arg Val	His V		30 Ala Thr	Pro Gln	
Gln Ala Arg 35	20 Ser Leu	Leu Gln	25 Arg Val 40	His V Arg A	rg Thr	3 0 A 1 a Thr 4 5	Pro Gln Ser Glu	
Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr	20 Ser Leu	Leu Gln Asn Pro	25 Arg Val 40	His V Arg A	rg Thr	3 0 A 1 a Thr 4 5	Pro Gln Ser Glu	
Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50	20 Ser Leu Phe Phe	Leu Gln Asn Pro	25 Arg Val 40 Arg Thr	His V Arg A Phe G	rg Thr	30 Ala Thr 45 Gly Glu	Pro Gln Ser Glu Ala Asp	
Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr	20 Ser Leu Phe Phe	Leu Gln Asn Pro	25 Arg Val 40 Arg Thr	His V Arg A Phe G Lys S	rg Thr	30 Ala Thr 45 Gly Glu	Pro Gln Ser Glu Ala Asp	
Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu	20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro	Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70	25 Arg Val 40 Arg Thr	His V Arg A Phe G Lys S 7	rg Thr ly Ser 60 er Leu 5	30 Ala Thr 45 Gly Glu Glu Asp	Pro Gln Ser Glu Ala Asp Lys Thr 80	
Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65	20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro	Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70	25 Arg Val 40 Arg Thr	His V Arg A Phe G Lys S 7	rg Thr ly Ser 60 er Leu 5	30 Ala Thr 45 Gly Glu Glu Asp	Pro Gln Ser Glu Ala Asp Lys Thr 80	
Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65	20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85	Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser	Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys	His V Arg A Phe G Lys S 7 Asp G 90	rg Thr ly Ser 60 er Leu 5	30 Ala Thr 45 Gly Glu Glu Asp	Pro Gln Ser Glu Ala Asp Lys Thr 80 Glu Gly 95	
Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu	20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85 Glu Ile 100	Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met	Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys Tyr Ile Ser Pro	His V Arg A Phe G Lys S 7 Asp G 90 Trp G	rg Thr ly Ser 60 er Leu 5 ly Arg	3 0 Ala Thr 4 5 Gly Glu Glu Asp Ile Val Met Leu 110	Pro Gln Ser Glu Ala Asp Lys Thr 80 Glu Gly 95 Phe Arg	

```
1 1 5
                           1 2 0
                                              1 2 5
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                       135
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                   150
                                      155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
               165
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
          180
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
       195
                           200
                                              205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                       2 1 5
                                           2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                   2 3 0
                             2 3 5
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
               2 4 5
                                   250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
           260
                               265
                                                   2 7 0
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
                                               285
       2 7 5
                           280
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Gly Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                       295
                                           3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                   3 1 0 3 1 5
3 0 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
               3 2 5 3 3 0
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
                               3 4 5
           3 4 0
                                                   3 5 0
< 2 1 0 > 9
< 2 1 1 > 1 0 5 6
< 2 1 2 > DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
      CDS
      (1)...(1056)
< 2 2 2 >
< 2 2 3 >
<400> 9
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                   48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
               5
                                   1.0
                                                                    96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                               2 5
           2.0
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                   1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
       35
                           4 0
                                               45
```

t a c	cag	a c t	t t c	t t c	a a t	C C g	agg	a c c	ttt	g g C	t c g	gga	gag	g c a	gac	192	
Туr	Gln	Thr	Phe	P h e	Asn		Arg	Thr	Phe	G 1 y	Ser	G 1 y	Glu	Ala	Asp		
	5 0					5 5					6 0						
t g t	ggg	$\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{g}$	сва	c c t	\mathfrak{c} t g	t t c	gag	a a g	aag	tcg	\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{g}	gag	gac	a a a	асс	2 4 0	
Cys	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr		
65					7 0					7 5					8 0		
gaa	aga	gag	ctc	ctg	gaa	t c c	t a c	a t c	gac	ggg	свс	a t t	gtg	gag	ggc	288	
	Arg																
				8 5					9 0	•				9 5	•		
t c g	gat	ø с а	ggg		ggc	a t ø	t c a	c c t		cag	g f g	a t ø	ctt		Cgg	3 3 6	
	Asp															0 0 0	
501	пор	πια	100	110	013	IVI C C	501	105	пр	0111	v a i	IVIC	110	1 11 0	11 1 5		
0 0 0	0 0 +	0.0.0		« o «	c t a	o t a	+ a +		a	0 0 0	0 1 0	0 t c		<i>a</i> 0 0	0.00	201	
	agt															3 8 4	
LÿS	Ser		GIN	GIU	Leu	Leu		GIY	AIa	s e r	Leu		5 e r	ASD	Arg		
		1 1 5					1 2 0					1 2 5					
	gtc															4 3 2	
Trp	V a l	Leu	Thr	Ala	Ala		Суѕ	Leu	Leu	Туr		Pro	Trp	Asp	Lуs		
	1 3 0					1 3 5					1 4 0						
аас	t t c	асс	gag	a a t	g a c	c t t	c t g	g t g	$c\ g\ c$	a t t	ggC	a a g	сас	t c c	C g C	4 8 0	
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	L e u	V a l	Arg	Пlе	Gly	Lys	His	Ser	Arg		
145					150					155					160		
аса	agg	t a c	gag	сва	аас	a t t	gaa	a a g	a t a	t c c	a t g	t t g	gaa	a a g	a t c	5 2 8	
Thr	Arg	Туr	Glu	Arg	Asn	Пe	Glu	Lys	11 e	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Пe		
				165					170					175			
t a c	a t c	сас	ССС	agg	t a c	аас	t g g	Сдд	gag	аас	c t g	gac	Сдд	gac	a t t	5 7 6	
	Пlе																
·			180		·		•	185				•	190	•			
g c c	ctg	atg		ctg	aag	aag	c c t		gcc	t t c	agt	gac		a t t	сас	6 2 4	
	Leu																
	2 0 4	195	2,5	2 0 4	2,5	2,5	200				~ .	205	. , .	• • •			
cct	gtg		c t g	ССС	gac	a a a		2 C g	g C A	g c c	age		ctc	cag	g c t	6 7 2	
	V a l															V . 2	
110	210	0,3	LCu	110	нор	215	oru	1 11 1	πια	A I a	2 2 0	Lou	LCu	0111	πια		
	tac	1 1 1		e a a	a t a		a a c	t a a	a a e	116		2 2 4	m n m	200	t a a	7 2 0	
	Tyr															7 2 0	
	1 9 1	Г й 2	GIY	Alg		1 11 1	GIŞ	ПP	UIJ		Leu	L) 2	ъти	1 11 1			
2 2 5			4 4		2 3 0				4	2 3 5	. 4			4	2 4 0	7.0.0	
	g C C															7 6 8	
Thr	Ala	Asn	V a I		Lys	Gly	GIn	Pro		V a I	Leu	GIn	V a I		Asn		
				2 4 5					250					2 5 5			
	$C \; C \; C$															8 1 6	
Leu	Pro	Пlе		Glu	Arg	Pro	Val		Lys	Asp	Ser	Thr		Пlе	Arg		
			260					265					270				
a t c	a c t	g a c	a a c	a t g	t t c	t g t	$\mathfrak{g} \mathfrak{c} \mathfrak{t}$	g g t	t a c	a a g	$c\ c\ t$	g a t	g a a	ggg	a a a	864	
Пlе	Thr	A s p	Asn	Met	P h e	C y s	Ala	Gly	Туr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys		
		2 7 5					280					285					
сва	ggg	g a t	gcc	t g t	g a a	g g t	g a c	$\mathfrak{g} \mathfrak{c} \mathfrak{t}$	ggg	gga	c c c	t t t	g t c	a t g	aag	9 1 2	
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	P h e	V a l	Met	Lys		
	290					295					3 0 0						
a g c	$C \; C \; C$	ttt	аас	аас	Свс	t g g	t a t	саа	a t g	ggc	a t c	g t c	$t\ c\ a$	t g g	g g t	960	
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Туr	Gln	Met	Gly	Пе	V a l	Ser	Trp	Gly		

```
3 0 5
                     3 1 0
                                          3 1 5
gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc
                                                                       1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                3 2 5
                                     3 3 0
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag
                                                                    1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
< 2 1 0 >
      1.0
<211> 351
< 2 1 2 >
      PRT
< 2 1 3 >
       Homo sapiens
<400> 10
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                                     1.0
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            2 0
                                25
                                                      3.0
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                             40
                                                  45
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                         5 5
                                              6.0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
     7 0
                                         75
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                8.5
                                     90
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            100
                                 105
                                                      1 1 0
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
        115
                             120
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
    130
                         1 3 5
                                             1 4 0
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                    150
                                         155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                    170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                                 185
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
        195
                             200
                                                  2 0 5
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                         2 1 5
                                              2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                    2 3 0
                                         235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                 265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        2 7 5
                             280
                                                  285
```

```
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
    290
                        2 9 5
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                    3 1 0
                                3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                3 2 5 3 3 0
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
                                                      350
< 2 1 0 > 1 1
<211> 1056
< 2 1 2 > DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 2 \ 2 \ 2 \rangle (1).. (1056)
< 223>
<400>
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                       4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                    1 0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                        96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            2.0
                                 2.5
                                                      3.0
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                       1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                            4 0
                                                 45
        3 5
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                       192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5 0
                        5 5
                                             6.0
                                                                       2 4 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                    7 0
                                         7.5
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                       288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                8.5
                                     90
                                                                       3 3 6
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            1 0 0
                                105
                                                                       384
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
        115
                            1 2 0
                                                 1 2 5
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                       4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
    1 3 0
                       135
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc
                                                                       480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
1 4 5
                    150
                                         155
                                                              160
```

a c a	agg t	t a c	gag	сва	a a c	a t t	gaa	a a g	a t a	$t\ c\ c$	a t g	t t g	gaa	a a g	a t c	5 2 8
Thr	Arg 7	Гуr	Glu	Arg 165	Asn	I I e	Glu	Lys	I I e 170	Ser	Met	Leu	Glu	Lys 175	Пе	
t a c	a t c	сас	ССС		t a c	аас	tgg	сдд		аас	ctg	gac	сдд		a t t	5 7 6
	lle F															*
- , -			180	0	. , .			185	• • •		2 0 %	р	190	р	• • •	
g c c	ctg a	atg	a a g	c t g	a a g	a a g	$c\ c\ t$	g t t	g C C	t t c	a g t	g a c	t a c	a t t	сас	6 2 4
Ala	Leu M	Met 195	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro 200	V a 1	Ala	P h e	Ser	Asp 205	Туr	I I e	His	
cct	gtg t		c t g	ССС	gac	эрр		асв	g C A	a c c	a g c		ctc	cag	g c t	672
	Val (0.1.2
110	210	, , 5	Бой	110	пор	215	0 I u	1 11 1	71 T W	71 T W	2 2 0	Боч	Боч	0111	71 1 U	
gga	t a c a	aag	ggg	Сдд	g t g	a c a	ggc	t g g	ggc	аас	c t g	aag	gag	асв	t g g	7 2 0
Gly	Tyr I	_ y s	Gly	Arg	V a l	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	
аса	g c c a	aac	gtt	g g t	aag	ggg	сав	ССС	a g t	g t c	c t g	сав	g t g	g t g	аас	768
	Ala A													Val		
				2 4 5					250					255		
ctg	000 8	att	gtg	gag	Сдд	ссв	gtc	t g c	aag	gac	t c c	асс	сдд	a t c	свс	8 1 6
	Pro 1													I 1 e		
			260					265	·	•			270		-	
a t c	act §	g a c	аас	a t g	t t c	t g t	g c t	g g t	t a c	a a g	$c\ c\ t$	g a t	gaa	ggg	a a a	8 6 4
Пlе	Thr A	q z F	Asn	Met	P h e	Сус	Ala	G 1 y	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
	2	2 7 5					280					285				
сва								a c t								9 1 2
Arg	Gly A	q s A	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	Thr	Gly	Gly	Pro	P h e	V a l	Met	Lys	
	290					295					3 0 0					
a g c	ccc t	ttt	аас	аас	C g C	t g g	t a t	саа	a t g	ggc	a t c	g t c	$t\ c\ a$	t g g	ggt	960
Ser	Pro F	h e	Asn	Asn	Arg	Trp	Туr	Gln	Met	Gly	II e	V a l	Ser	Trp	Gly	
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
gaa	g g C	t g t	gac	Сдд	$g\ a\ t$	ggg	a a a	t a t	g g C	t t c	t a c	a c a	$c\ a\ t$	g t g	t t c	1008
Glu	G] y () y s	Asp	Arg	A s p	Gly	Lys	Туr	Gly	P h e	Tyr	Thr	H i s	V a l	P h e	
				3 2 5					3 3 0					3 3 5		
c g c	ctg a	aag	aag	t g g	a t a	cag	aag	g t c	a t t	g a t	cag	t t t	gga	gag	t a g	1056
Arg	Leu I	_ y s	Lys	Trp	Ιlе	Gln	Lys	V a l	I l e	Asp	Gln	P h e	Gly	Glu		
			3 4 0					3 4 5					350			
< 21 ()> 12	2														
< 2 1 1	> 35	51														
< 2 1 2	P = P = P	R T														
< 2 1 3	3> H (0 m o	s a p	iens												
/ / / / /	1 \ 1 ()														
)> 12		V a 1	۸ ~	f 1	I	ſ 1	I	D	ſ 1	C	I	A 1 ^	I	A 1 a	
wet 1	Ala F	118	v a I	Arg 5	υIУ	ьeu	6 I N	ьеи	Pro 10	ъIУ	∪ y S	Lеu	AIA	Leu 15	AIa	
Ala	Leu (. V S	Ser		Val	Hic	Ser	(_r 1 n		V a 1	Phe	L e 11	Ala		(, 1 n	
11 U	Dou (ں ر ۔	20	_ vu	. u 1	1111	~ 0 1	25	** 1 7	· u 1	0	_ ∪ u	30		V 1 II	
Gln	Ala A	Arg 35	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg 40	V a l	Arg	Arg	Thr	A 1 a 4 5	Thr	Ser	Glu	

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp

```
5 0
                       5 5
                                           6 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                   7.0
                                       7 5
6 5
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
               8 5
                                   90
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
       100
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                          1 2 0
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
           1 3 5
                                   1 4 0
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
     150
                                      155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                                  170
               165
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                 185
          180
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                           200
       195
                                              205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
    2 1 0
                       2 1 5
                                           2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                   2 3 0
                                      2 3 5
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
               2 4 5
                                   250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
           260
                              265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
       2 7 5
               280
                                   285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Thr Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                      295
                                           3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
       3 1 0
                              3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                                  3 3 0
               3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
           3 4 0
                               3 4 5
                                                  350
< 2 1 0 > 1 3
<211> 1056
<212> DNA
< 2 1 3 >
     Homo sapiens
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
       CDS
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
< 2 2 3 >
```

< 4 0 0 > 1 3

Met	Ala	H i s	V a l	Arg 5	G 1 y	Leu	Gln	Leu	Pro	G 1 y	Суѕ	Leu	Ala	L e u 1 5	Ala		
	ctg Leu															9 6	
	g c a A l a		t c g					g t c					асс			1 4 4	
	cag Gln 50	a c t					agg					gga				192	
	g g g G l y					t t c					c t g					2 4 0	
g a a	aga Arg				g a a					ggg					g g C	2 8 8	
	g a t A s p			a t c					t g g					t t c		3 3 6	
	agt Ser		сав					g g g					a g t			3 8 4	
	g t c V a l 1 3 0	\mathfrak{c} t \mathfrak{c}					t g c				Pro	c c c				4 3 2	
Asn	t t c P h e				Asp	c t t				Ilе					Arg	480	
	agg A r g			Arg					I1e					Lys		5 2 8	
	atc Ile		Pro					Arg					Arg			576	
	ctg Leu	Met					Pro					Asp				6 2 4	
	g t g V a l					Arg					Ser					6 7 2	
Gly	2 1 0 t a c T y r				Val					Asn					Trp	7 2 0	
	g c c A l a			G 1 y					Ser					V a l		7 6 8	
	c c c P r o															816	

	a c t T h r	Asp					Ala					Asp				8 6 4
сва	ggg	2 7 5 g a t	gcc	t g t	gaa	g c t	2 8 0 g a c	g c t	ggg	gga	ссс	2 8 5 t t t	g t c	a t g	a a g	9 1 2
Arg	G 1 y 2 9 0	Asp	Ala	Суѕ	Glu	A 1 a 2 9 5	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro 300	P h e	Val	Met	Lys	
	ccc Pro															960
3 0 5	g g C				3 1 0					3 1 5					3 2 0	1008
	Gly															1 0 0
	ctg Leu														t a g	1 0 5 6
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			
< 2 1 < 2 1		l 4 3 5 1														
< 2.1	2 > F	RT														
< 2 1 3			sapi	i e ii s												
	0 > 1 A 1 a		V a l	Arg 5			Gln		Pro	G 1 y	Суѕ	L e u	Ala	L e u 1 5	Ala	
	L e u	Суѕ	S e r 2 0							V a l	P h e	Leu	A 1 a		Gln	
Gln	Ala	Arg 35		L e u	Leu	Gln	Arg 40		Arg	Arg	Thr	A 1 a 4 5		Ser	Glu	
	G 1 n 5 0	Thr					Arg						Glu	Ala	Asp	
C y s 6 5	G 1 y	Leu	Arg	Pro	L e u 7 0	P h e	Glu	Lys	Lys	S e r 7 5	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr 80	
	Arg	Glu	Leu	L e u 8 5	Glu	Ser	Tyr	I 1 e	A s p 9 0	Gly	Arg	I 1 e	V a l	G 1 u 9 5	G 1 y	
Ser	Asp	Ala	G 1 u 1 0 0	I 1 e	Gly	Met	Ser	Pro 105	Trp	Gln	V a l	Met	L e u 1 1 0	P h e	Arg	
Lys	Ser	Pro 115	Gln	Glu	Leu	Leu	C y s 1 2 0	G 1 y	Ala	Ser	Leu	I 1 e 1 2 5	Ser	Asp	Arg	
Trp	V a 1 1 3 0	Leu	Thr	Ala		H i s 1 3 5	Суs	Leu	Leu	Tyr	Pro 140	Pro	Trp	Asp	Lys	
A s n 1 4 5	P h e		Glu			Leu	Leu	V a l	Arg	II e 155	G 1 y	Lys	His	Ser	Arg 160	
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg 165	Asn	I 1 e	Glu		I 1 e 1 7 0	Ser	Met	Leu	Glu	L y s 175	I l e	
Туr	I 1 e	His	Pro 180		Туr	Asn	Trp			Asn	Leu	Asp	Arg 190		I l e	
Ala	Leu	Met 195		Leu	Lys	Lys	Pro 200		Ala	P h e	Ser	A s p 2 0 5		I 1 e	His	
Pro	V a 1 2 1 0		Leu	Pro	Asp	Arg 215		Thr	Ala	Ala	S e r 2 2 0		Leu	Gln	Ala	

```
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
2 2 5
                    2 3 0 2 3 5
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                   250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        2 7 5
                            280
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
    2 9 0
                        295
                                            3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                    3 1 0
                                        3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                                   3 3 0
                3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                3 4 5
<210> 15
<211> 1056
< 2 1 2 > DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 2 \ 2 \ 2 \rangle (1)...(1056)
< 2 2 3 >
<400> 15
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                     4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
               5
                                   1.0
                                                                      96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                25
            2.0
                                                                     144
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        35
                            4 0
                                                4.5
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                     192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5 0
                        5 5
                                            6 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                     2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
6 5 7 0 7 5
                                                                     288
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                85
                                    9 0
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
                                                                     336
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
           1 0 0
                1 0 5
                                                    1 1 0
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
                                                                     384
```

Lys	Ser	Pro	G 1 n	Glu	Leu	Leu	C y s 1 2 0	G 1 y	Ala	Ser	L e u	I 1 e 1 2 5	Ser	Asp	Arg	
t g g	gtc	ctc	асс	gcc	gcc	сас	t g c	ctc	ctg	t a c	ссв	ссс	t g g	gac	aag	4 3 2
							Суѕ									
	1 3 0					135	•				1 4 0				_ •	
аас	ttc	асс	gag	aat	gac		ctg	g t g	cgc	a t t		2 2 g	cac	t c c	Cac	480
	Phe						Leu									100
1 4 5	1110	1 11 1	oru	11 2 11	150	L C u	ьсu	, a 1	11 1 6	155	01,	гја	111 2	501	160	
аса	2 0 0	tac	m n m	e a a		1 t t	m 1 1	2 2 6	2 t 2		n f a	t t a	a a a	aag	a t c	5 2 8
							gaa									J Z O
1 11 1	AIg	1 9 1	ъти		A 2 II	116	Glu	Г й 2		261	wet	Leu	GIU		116	
4				165			4		170		. 4			175		r 7 c
							t g g									5 7 6
ı y r	1 1 e	HIS		Arg	ıyr	Asn	Trp		6 I U	Asn	Leu	ASD		ASD	1 1 e	
			180					185					190			0.0.4
							cct									6 2 4
Ala	Leu		Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	V a I	Ala	Phe	Ser		Tyr	Пе	Hıs	
		195					200					2 0 5				
cct	-						gag									672
Pro		Сус	Leu	Pro	Asp		Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	2 1 0					2 1 5					2 2 0					
gga	t a c	a a g	ggg	C g g	g t g	$a \in a$	ggc	t g g	ggC	a a c	ctg	a a g	gag	a c g	t g g	7 2 0
G 1 y	Туr	Lys	G 1 y	Arg	Val	Thr	G 1 y	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	
a c a	gcc	аас	g t t	g g t	a a g	ggg	cag	$C \; C \; C$	a g t	g t c	сtg	cag	g t g	g t g	аас	768
Thr	Ala	Asn	V a 1	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	V a l	L e u	Gln	V a l	V a l	Asn	
				2 4 5					250					255		
c t g	$C \; C \; C$	a t t	g t g	gag	c g g	$C \; C \; B$	g t c	$t \ g \ c$	a a g	gac	$t\ c\ c$	асс	c g g	a t c	c g c	8 1 6
Leu	Pro	Пlе	V a l	Glu	Arg	Pro	V a l	Суѕ	Lys	A s p	Ser	Thr	Arg	Пlе	Arg	
			260					265					2 7 0			
a t c	$a\mathrel{\varepsilon} t$	gac	аас	a t g	t t c	t g t	$\mathfrak{g}\mathfrak{c}\mathfrak{t}$	g g t	$t\ a\ c$	aag	$c\ c\ t$	$g \ a \ t$	gaa	ggg	a a a	864
Пe	Thr	A s p	Asn	Met	P h e	Суѕ	Ala	Gly	Туr	Lys	Pro	Asp	Glu	G 1 y	Lys	
		2 7 5					280					285				
сва	ggg	$g\ a\ t$	gcc	t g t	gaa	g g t	g a c	g t t	ggg	gga	c c c	t t t	g t c	a t g	aag	9 1 2
Arg	Gly	Asp	Ala	Cys	Glu	Gly	Asp	V a l	Gly	Gly	Pro	P h e	V a l	Met	Lys	
	290					295					3 0 0					
a g c	c c c	t t t	аас	аас	свс	t g g	t a t	саа	a t g	ggc	a t c	gtc	$t\ c\ a$	t g g	ggt	960
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Туr	Gln	Met	Gly	Пe	V a l	Ser	Trp	G 1 y	
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
	ggc	t g t	gac	Сдд	gat	ggg	a a a	tat	ggc		t a c	аса	cat	gtg	t t c	1008
							Lys								Phe	
·	•	•	•	3 2 5	•	•	•	•	3 3 0		•			3 3 5		
сяс	ctg	aag	aag		a t a	сад	aag	gtc		gat	сая	ttt	gga		t a g	1056
							Lys									• •
0		_ , ~	3 4 0	- - r		• • ••	- • •	3 4 5		- P	**		350			

<210> 16

<211> 351

< 2 1 2 > PRT

<213> Homo sapiens

< 4 0 () >	1 6													
Met 1	Ala	His	V a l	Arg 5			Gln			Gly				L e u 1 5	Ala
Ala	Leu	Суѕ	S e r 2 0	L e u										Pro	Gln
Gln	Ala	Arg 35	Ser	L e u	L e u	Gln	Arg 40	V a l	Arg	Arg	Thr	A 1 a 4 5	Thr	Ser	Glu
Tyr	G 1 n 5 0		P h e	P h e	Asn	Pro 55		Thr	P h e	Gly	Ser 60		Glu	Ala	Asp
C y s 6 5		L e u	Arg	Pro	L e u 7 0		Glu	L y s	Lys	Ser 75		Glu	Asp	L y s	Thr
	Arg	Glu	L e u				Туr			Gly				G 1 u 9 5	
Ser	Asp	Ala	G l u 1 0 0						Trp		Val	Met		P h e	Arg
Lys	Ser	Pro 115		Glu						Ser		II e 125	Ser	Asp	Arg
Trp	V a l 1 3 0			Ala					Leu	Tyr		Pro	Trp	Asp	Lys
A s n 1 4 5	P h e		Glu			L e u	L e u					Lys		Ser	Arg 160
Thr	Arg	Tyr	Glu	Arg 165			Glu			Ser		Leu			lle
Tyr	I 1 e	His	Pro 180			Asn			Glu	Asn	L e u			Asp	I 1 e
Ala	Leu	Met 195		L e u						P h e			Туr	I l e	His
Pro	V a l 2 1 0	Суѕ	L e u	Pro	Asp	Arg 215	Glu						Leu	Gln	Ala
G 1 y 2 2 5	Туr	Lys	Gly	Arg	V a 1 2 3 0	Thr	Gly	Trp	Gly	A s n 2 3 5	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp 240
Thr	Ala	Asn	V a l	G 1 y 2 4 5	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser 250	V a l	Leu	Gln	V a l	V a 1 2 5 5	Asn
Leu	Pro	Ile	V a 1 2 6 0	Glu	Arg	Pro	V a l	C y s 2 6 5	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg 270	Ile	Arg
Ile	Thr	A s p 2 7 5	Asn	Met	P h e	C y s	A 1 a 2 8 0	Gly	Туr	Lys	Pro	A s p 2 8 5	Glu	Gly	Lys
Arg	G 1 y 2 9 0	Asp	Ala	Суѕ	Glu	G l y 2 9 5	Asp	Ala	Gly	Gly	Pro 300	P h e	V a l	Met	Lys
Ser 305	Pro	P h e	Asn	Asn	Arg 310	Trp	Tyr	Gln	Met	G 1 y 3 1 5	I I e	V a l	Ser	Trp	G 1 y 3 2 0
Glu	Gly	C y s	Asp	Arg 325	Asp	Gly	Lys	Туr	G 1 y 3 3 0	P h e	Туr	Thr	His	V a 1 3 3 5	P h e
Arg	Leu	Lys	L y s 3 4 0	Trp	Ile	Gln	Lys	V a l 3 4 5	I I e	Asp	Gln	P h e	G 1 y 3 5 0	Glu	

< 2 1 0 > 1 7

< 2 1 1 > 1 0 5 6

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 222 \rangle (1).. (1056)
< 2 2 3 >
\langle 4 \ 0 \ 0 \rangle = 1 \ 7
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                       4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                    1.0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                       96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            2.0
               2 5
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                      1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                            4 0
                                                                      192
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                        5 5
                                             6.0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                      2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                    7.0
                                        7.5
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                      288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
                85
                                     9 0
                                                                      336
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            1 0 0
                                105
                                                     110
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
                                                                      3 8 4
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
            1 2 0
       115
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                      4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                  1 3 5
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc
                                                                      480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                    150
1 4 5
                                        155
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc
                                                                      5 2 8
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                            1 7 0
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att
                                                                      5 7 6
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
          180
                                                                      6 2 4
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                            200
        195
                                                 205
cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct
                                                                      672
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                        2 1 5
                                             2 2 0
```

gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac ctg aag gag acg tgg

7 2 0

G 1 y 2 2 5	Tyr	L y s	Gly	Arg	V a l 2 3 0	Thr	Gly	Trp	Gly	A s n 2 3 5	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp 240	
	gcc	аас	gtt	g g t	aag	ggg	сав	ССС	a g t	gtc	ctg	сав	gtg	gtg		768
	Ala													Val		
				2 4 5	_,,				250					255		
cts	ССС	a t t	g t g		Caa	ccg	gtc	t ø c		gac	t c c	200	C g g	a t c	CgC	8 1 6
	Pro															010
ь	. 110	110	260	oru	11 1 6	110	* 4 1	265	נום	пор	501	1 11 1	270	110	11 1 8	
n t c	a c t	a o c		a t a	t t c	t a t	a c t		tac	0 0 0	c c t	a a t		ggg	0 0 0	8 6 4
	act The		a a c													004
116	Thr	2 7 5	Asn	wet	rne	C) S	2 8 0	GIY	1 y 1	Г ў 2	110	285	GIU	GIY	Г й 2	
C g a	ggg	g a t	gcc	t g t	g a a	g g t	gac	g a t	ggg	gga	$C \; C \; C$	t t t	g t c	a t g	aag	9 1 2
Arg	G 1 y	Asp	Ala	Суѕ	Glu	Gly	Asp	Asp	Gly	G 1 y	Pro	Phe	V a l	Met	Lys	
	290					295					3 0 0					
a g ($C \;\; C \;\; C$	t t t	аас	аас	$c\ g\ c$	t g g	t a t	саа	a t g	ggc	a t c	g t c	$t\ c\ a$	t g g	ggt	960
Sei	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Туr	Gln	Met	Gly	Ile	V a l	Ser	Trp	Gly	
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
gaa	ggc	t g t	gac	Сдд	g a t	ggg	a a a	t a t	g g C	t t c	t a c	аса	cat	gtg	t t c	1008
Glu	G 1 y	Суѕ	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Туr	Gly	Phe	Туr	Thr	His	Val	Phe	
				3 2 5					3 3 0					3 3 5		
C g (ctg	aag	aag	t g g	a t a	сав	aag	gtc	a t t	gat	сав	ttt	gga	gag	t a g	1056
	Leu															
		·	3 4 0	-			·	3 4 5		•			3 5 0			
< 2 1	0 >	18														
< 2 1		351														
< 2]	2 >	PRT														
	2 >	PRT	sap	iens												
< 2 1 < 2 1	2 >	PRT Homo	sap	iens												
< 2 1 < 2 1 < 4 (2 > 3 >	PRT Homo	-		Gly	L e u	Gln	Leu	Pro	G 1 y	Суѕ	Leu	Ala	Leu	Ala	
< 2 1 < 2 1 < 4 (2 > 3 > 0 >	PRT Homo	-		Gly	L e u	Gln	Leu	Pro 10	G 1 y	Суѕ	Leu	Ala	Leu 15	Ala	
< 2 1 < 2 1 < 4 (Metallar)	2 > 3 > 0 >	PRT Homo 18 His	V a l	Arg 5					1 0					15		
< 2 1 < 2 1 < 4 (Metallar)	2 > 3 > 0 > A 1 a	PRT Homo 18 His	V a l	Arg 5					1 0					15		
< 2 1 < 2 1 < 4 (Me t 1 A 1 a	2 > 3 > 0 > Ala	PRT Homo 18 His Cys	Val Ser 20	Arg 5 Leu	V a l	His	Ser	G 1 n 2 5	10 His	V a 1	P h e	Leu	A 1 a 3 0	15 Pro	Gln	
< 2 1 < 2 1 < 4 (Me t 1 A 1 a	2 > 3 > 0 > A 1 a	PRT Homo 18 His Cys	Val Ser 20	Arg 5 Leu	V a l	His	Ser	G 1 n 2 5	10 His	V a 1	P h e	Leu	A 1 a 3 0	15 Pro	Gln	
< 2 1 < 2 1 < 4 0 Me t 1 A 1 a G 1 r	2 > 3 > 0 > Ala a Ala	PRT Homo 18 His Cys Arg 35	Val Ser 20 Ser	Arg 5 Leu Leu	V a l L e u	His Gln	Ser Arg 40	G 1 n 2 5 V a 1	1 0 H i s A r g	V a l A r g	Phe Thr	Leu Ala 45	A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser	Gln Glu	
< 2 1 < 2 1 < 4 0 Me t 1 A 1 a G 1 r	2 > 3 > 0 > Ala a Leu Gln	PRT Homo 18 His Cys Arg 35	Val Ser 20 Ser	Arg 5 Leu Leu	V a l L e u	His Gln Pro	Ser Arg 40	G 1 n 2 5 V a 1	1 0 H i s A r g	V a l A r g	Phe Thr Ser	Leu Ala 45	A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser	Gln Glu	
<pre>< 2 1 < 2 1 < 4 (Me t 1 A 1 a G 1 r</pre>	2 > 3 > 0 > Ala Leu Ala Gln 5 0	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr	V a 1 S e r 2 0 S e r	Arg 5 Leu Leu Phe	V a l L e u A s n	His Gln Pro 55	Ser Arg 40 Arg	G 1 n 2 5 V a 1 T h r	10 His Arg Phe	Val Arg Gly	Phe Thr Ser 60	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr	15 Pro Ser Ala	Gln Glu Asp	
<pre>< 2 1 < 2 1 < 4 0 Me t 1 A 1 a G 1 r T y 1</pre>	2 > 3 > 0 > Ala a Leu Gln	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr	V a 1 S e r 2 0 S e r	Arg 5 Leu Leu Phe	Val Leu Asn Leu	His Gln Pro 55	Ser Arg 40 Arg	G 1 n 2 5 V a 1 T h r	10 His Arg Phe	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr	15 Pro Ser Ala	Gln Glu Asp Thr	
<pre>< 2 1 < 2 1 < 4 0 Me 0 1 A 1 a G 1 r C y s 6 5</pre>	2 > 3 > 0 > Ala Leu Ala Gln 50 Gly	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr	Val Ser 20 Ser Phe	Arg 5 Leu Leu Phe	Val Leu Asn Leu 70	His Gln Pro 55 Phe	Ser Arg 40 Arg Glu	G 1 n 2 5 V a 1 T h r	10 His Arg Phe Lys	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60 Leu	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys	G 1 n G 1 u A s p T h r 8 0	
<pre>< 2 1 < 2 1 < 4 (Me t 1 A 1 a G 1 r T y r C y s 6 5 G 1 t</pre>	2 > 3 > 0 > Ala Leu Ala Gln 50 Gly Arg	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu	Arg 5 Leu Phe Pro	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr	G 1 n 2 5 V a 1 T h r L y s	1 0 H i s A r g P h e L y s A s p 9 0	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu	Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95	G 1 n G 1 u A s p T h r 8 0 G 1 y	
<pre>< 2 1 < 2 1 < 4 (Me t 1 A 1 a G 1 r T y r C y s 6 5 G 1 t</pre>	2 > 3 > 0 > Ala Leu Ala Gln 50 Gly	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu	Arg 5 Leu Phe Pro	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr	Gln 25 Val Thr Lys Ile	1 0 H i s A r g P h e L y s A s p 9 0	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu	A 1 a 3 0 T h r G 1 u A s p V a 1 L e u	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95	G 1 n G 1 u A s p T h r 8 0 G 1 y	
<pre>< 2 1 < 2 1 < 4 (Me t 1 A 1 a G 1 r T y r C y s 6 5 G 1 t S e r</pre>	2 > 3 > 0 > Ala Leu Ala Gln 50 Gly Arg	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser	G 1 n 2 5 V a 1 Th r Lys I 1 e Pro 1 0 5	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	A 1 a 3 0 T h r G 1 u A s p V a 1 L e u 1 1 0	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
<pre>< 2 1 < 2 1 < 4 (Me t 1 A 1 a G 1 r T y r C y s 6 5 G 1 t S e r</pre>	2 > 3 > 0 > Ala Leu Ala Gln 50 Gly Arg	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys	G 1 n 2 5 V a 1 Th r Lys I 1 e Pro 1 0 5	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	A 1 a 3 0 T h r G 1 u A s p V a 1 L e u 1 1 0	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
<pre>< 2 1 < 2 1 < 4 (Me t 1 A 1 a G 1 r T y r C y s 6 5 G 1 t L y s</pre>	2 > 3 > 0 > Ala	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro 115	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met Leu	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5 G 1 y	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg	
<pre>< 2 1 < 2 1 < 4 (Me t 1 A 1 a G 1 r T y r C y s 6 5 G 1 t L y s</pre>	2 > 3 > 0 > Ala	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro 115	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu	His GIn Pro 55 Phe Ser Met Leu His	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5 G 1 y	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg	
<pre><21 <22 <4 (Me t 1 A 1 a G 1 r C y s 6 5 G 1 t L y s T r r</pre>	2 > 3 > 0 > A 1 a	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro 115 Leu	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln Thr	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu Ala	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu Ala	His Gln Pro 55 Phe Ser Met Leu His 135	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120 Cys	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5 G 1 y Le u	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp Ala Leu	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro 140	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125 Pro	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe Asp	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg Lys	
<pre><21 <22 <4 (Me t 1 A 1 a G 1 r T y r C y s 6 5 G 1 u S e r L y s T r r A s r</pre>	2 > 3 > 0 > Ala a Leu Ala Gln 50 Gly Arg Asp Ser Val 130 Phe	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro 115 Leu	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln Thr	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu Ala	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu Ala Asp	His Gln Pro 55 Phe Ser Met Leu His 135	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120 Cys	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5 G 1 y Le u	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp Ala Leu	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro 140	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125 Pro	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe Asp	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg Lys	
<pre><21 <22 <4 (Me t 1 A 1 a G 1 r C y s 6 5 G 1 t L y s T r r</pre>	2 > 3 > 0 > Ala a Leu Ala Gln 50 Gly Arg Asp Ser Val 130 Phe	PRT Homo 18 His Cys Arg 35 Thr Leu Glu Ala Pro 115 Leu	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln Thr	Arg 5 Leu Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu Ala	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu Ala	His Gln Pro 55 Phe Ser Met Leu His 135	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120 Cys	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5 G 1 y Le u	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp Ala Leu	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro 140	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125 Pro	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe Asp	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg Lys	

```
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                    170
               165
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
           180
                     185
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
       195
                            200
                                                 205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                        2 1 5
                                             2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225
                    2 3 0
                                        235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                 265
                                                     270
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
                            280
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Asp Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
    2 9 0
                       295
                                             3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                          3 1 5
                    3 1 0
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                        3 3 0
                3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                3 4 5
                                                     350
< 2 1 0 > 1 9
<211> 1056
< 2 1 2 > DNA
< 2 1 3 >
      Homo sapiens
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
       CDS
\langle 2 \ 2 \ 2 \rangle (1).. (1056)
< 2 2 3 >
<400> 19
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                       48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                    1 0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                       96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            2 0
                                25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                      1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        3 5
                            4 0
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                      1 9 2
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                        5 5
                                             6.0
                                                                      2 4 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
```

65 70 75 75 80 80 80 80 80 80 80 8	2 8 8 3 3 6 3 8 4 4 3 2 4 8 0
Secondary Seco	3 3 6 3 8 4 4 3 2 4 8 0 5 2 8
Sat Sat	3 8 4 4 3 2 4 8 0 5 2 8
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg aag agt ccc cag gag ctg cgg acc agc acc agc cgc cgc agg ccc agc acg	3 8 4 4 3 2 4 8 0 5 2 8
The column The	4 3 2 4 8 0 5 2 8
aag agt ccc cag gag ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg tgg gtc ctc gcc cac tgc ctc ctc ccg ccc tgg aag ctc ctg cgc aag aag aag aag ctg ctg cgc aag aag aag ctg ctg cgc atg cgc aag aag ctg cgc atg aag cgc cgc atg aag cgc cgc atg aag aag atg cgc atg atg aag	4 3 2 4 8 0 5 2 8
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Asp Arg tgg gtc ctc acc gcc gcc ctc ctc ccg ccc tgg gac aag Trp Val Leu Thr Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys 130	4 3 2 4 8 0 5 2 8
115 120 125 tag gtc ctc gcc gcc ctc ctc ctg tac ccc tgg gac aag Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Pro Trp Asp Lys aac ttc acc gag aat gac ctt ctg cgc att gag aat cgc ctg cgc att ggc aag cgc cgc Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Val Arg lle Gly Lys His Ser Arg 145	480
tgg gtc ctc acc gcc gcc tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag Trp Val Leu Thr Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Pro Trp Asp Lys aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcg Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg lle Gly Lys His Ser Arg Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg lle Lys Its	480
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg 145	480
130 135 140 aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg 145 aca agg tac gag cga aac aac att gaa aag ata tcc Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile 160 170 atc atc atc ccc agg tac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att	5 2 8
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg 145	5 2 8
145	
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile 165 - 170 - 175 tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att	
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile 165 170 175 tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att	
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att	F. F. ^
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att	c c ^
	576
	0.0
180 185 190	
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac	6 2 4
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His	
195 200 205	0.7.0
ect gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct	672
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala 210 215 220	
gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac ctg aag gag acg tgg	7 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp	
2 2 5 2 3 0 2 3 5 2 4 0	
aca gcc aac gtt ggt aag ggg cag ccc agt gtc ctg cag gtg gtg aac	768
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn	
245 250 255	0 1 £
ctg ccc att gtg gag cgg ccg gtc tgc aag gac tcc acc cgg atc cgc Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg	8 1 6
260 265 270	
atc act gac aac atg ttc tgt gct ggt tac aag cct gat gaa ggg aaa	8 6 4
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys	
275 280 285	
cga ggg gat gcc tgt gaa ggt gac aat ggg gga ccc ttt gtc atg aag	9 1 2
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Asn Gly Gly Pro Phe Val Met Lys	
290 295 300	0.6.0
agc ccc ttt aac aac cgc tgg tat caa atg ggc atc gtc tca tgg ggt Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly	960
305 310 315 320	
	1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe	
3 2 5 3 3 0 3 3 5	
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag	1056

```
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
< 2 1 0 >
       2 0
<211>
       351
< 2 1 2 >
      PRT
< 2 1 3 >
       Homo sapiens
< 4 0 0 >
       2.0
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                                     1 0
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                 25
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                            4 0
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5 0
                         5 5
                                              6.0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                    7.0
                                         7.5
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
                                     9.0
                8 5
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            1 0 0
                                 105
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                            1 2 0
        115
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                        1 3 5
                                             140
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
1 4 5
            150
                                   155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                    1 7 0
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
           180
                          185
                                                     190
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                             200
        195
                                                  205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
    2 1 0
                         2 1 5
                                              2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225
                    2 3 0
                                         235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
                                                      270
            260
                                 265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
                             280
                                                  285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Asn Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
             2 9 5
    290
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                    3 1 0
                                         3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
```

Arg Leu Lys L	325 Lys Trp Ile 340	Gln Lys Val 345	330 Ile Asp Gln	Phe Gly 350	3 3 5 G 1 u
<210> 21					
<211> 1056 <212> DNA					
	sapiens				
<220>					
<221> CDS <222> (1)	(1056)				
<223>	(1030)				
< 4 0 0 > 2 1					
atg gcg cac g					
Met Ala His V	val Arg Gly 5	Leu GIn Leu	Pro Gly Cys	Leu Ala	Leu Ala 15
gcc ctg tgt a		cac age cag		cto oct	
Ala Leu Cys S					-
2	2 0	2 5		3 0	
caa gca cgg t					agt gag 144
Gln Ala Arg S	Ser Leu Leu		Arg Arg Thr		Ser Glu
35 tac cag act t	tto tto aat	40	ttt gar tra	45 	gca gac 192
Tyr Gln Thr F					
5 0		5 5	6 0	•	·
tgt ggg ctg c					a a a a c c 2 4 0
Cys Gly Leu A		Phe Glu Lys		Glu Asp	
65	70 ata ata aa	too too oto	75	0 + +	80
gaa aga gag c Glu Arg Glu L					
ord Are ord E	85		90	110 , 41	95
teg gat gea g	gag atc ggc	atg tca cct	tgg cag gtg	atg ctt	ttc cgg 336
Ser Asp Ala 0			Trp Gln Val	Met Leu	Phe Arg
	100	105		110	2.0.1
aag agt ccc c Lys Ser Pro 0					
115		1 2 0		1 2 5	
tgg gtc ctc a					gac aag 432
Trp Val Leu T 130	Ihr Ala Ala	His Cys Leu 135	Leu Tyr Pro 140	Pro Irp	Asp Lys
			cgc att ggc		
Asn Phe Thr C				Lys His	
145 aca agg tac g	150 gag cga aac		155 ata tcc atg	t to oaa	1 6 0 a a g a t c 5 2 8
Thr Arg Tyr (
Ų - V - V	165	, ~	170		175
tac atc cac o					a a c a t t 5 7 6
Tyr Ile His P	Pro Arg Tyr	Asn Trp Arg	Glu Asn Leu	Asp Arg	Asn Ile

180			180		1	1 O E			1.0.0		
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr He His 180 190 200	a c c	eta ota		0 0 0 0 0 0			tte oe	at anc	190	0.00	624
185											0 4
Cot Mile Ref Cot Cot	ΑΙα		гуз геп	F) 2 F) 2		val Ala	Inc Sc		1) 1 1 1 5	11 1 2	
Pro	cct		cta ccc	2 3 C 3 2 2		arg gra	g C C 3 g		ctc cag	g c t	672
210											0 1 5
Sear Late Case Sear Case Sear Sear Case Sear Case Ca	110		Dod 110		oru i	1111 /114			Lou oin	71 T U	
City Tyr Lys City Arg Val Thr City Thr City Lys City Cas C	gga		ggg Cgg		ggc t	tgg ggc			gag acg	† g g	7.2.0
225		-									
The Ala Ash Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Ceu Gln Val Val Ash Ash Ash Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Ash Ash Ash Cas		.,,.	* 1 , 0								
The Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro 250		gcc aac	gtt ggt		cag c	ccc agt		tg cag	gtg gtg		768
Case										Asn	
Color			2 4 5			250			2 5 5		
Second S	c t g	ccc att	gtg gag	с g g с с g	g t c t	tgc aag	gac to	сс асс	cgg atc	С g С	8 1 6
Second S	Leu	Pro Ile	Val Glu	Arg Pro	Val C	Cys Lys	Asp Se	er Thr	Arg Ile	Arg	
The Thr Asp Asp Asp Asp Asp Asp Color Colo			260		2	265			2 7 0		
275	a t c	act gac	aac atg	ttc tgt	g c t g	ggt tac	aag co	ct gat	gaa ggg	a a a	864
See See	I 1 e	-	Asn Met	Phe Cys	Ala G	Gly Tyr	Lys Pr	ro Asp	Glu Gly	Lys	
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Gly Pro Phe Val Met Lys 290											
290											9 1 2
Ser Pro Phe Ash Ash	Arg		Ala Cys		Asp A	Ala Gly			Val Met	Lуs	
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gly 305						,					0.00
305 310	-										960
Sala SgC tgt Sac cgg gat sgg aaa tat sgc ttc tac aca cat stg ttc 1008		Pro Phe	Asn Asn		lyr G	ıln Met		ie vai	Ser Irp		
Clu Cly Cys Asp Asp Asp Asp Cly Lys Tyr Cly Phe Tyr Thr His Val Phe 335 Cgc Ctg aag aag tag ata cag aag aag tag tag aag tag tag					000 +	+ o +					1 0 0 0
Case case aas aa											1000
C C C C C C C C C C	Glu	GIY CYS			L 3 2 I		ine i)	y 1 1111			
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu 350 <pre></pre>	C a C	cto aao			22g g		gat ca	ag ttt			1056
Sample S											1000
<pre></pre>	711 0			110 011			nop or	1111			
<pre></pre>											
<pre></pre>	< 21 () > 22									
	< 2 1 1	> 351									
	< 2 1 2	PRT									
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln Ala Leu Ser Leu Val His Val Phe Leu Ala Pro Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Ass Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Asp Thr Tyr Gly Leu Arg Pro Arg Thr Phe Gly Ser Leu Asp Thr Tyr Gly Leu Arg Pro <t< td=""><td>< 2.1.3</td><td>B > Homo</td><td>sapiens</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></t<>	< 2.1.3	B > Homo	sapiens								
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln Ala Leu Ser Leu Val His Val Phe Leu Ala Pro Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Ass Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Asp Thr Tyr Gly Leu Arg Pro Arg Thr Phe Gly Ser Leu Asp Thr Tyr Gly Leu Arg Pro <t< td=""><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></t<>											
1 Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln 25 Gln Ala Arg Ser Leu Beu Gln 40 Arg Arg Ser Leu Leu Gln 40 Tyr Gln Thr Phe So F So Ser Leu Phe Arg Tyr So Ser So So Ser Ser So Ser Ser So Ser So Ser So Ser Ser So Ser Ser So Ser So Ser Ser Ser So Ser											
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln 25 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu 35 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp 50 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr 80 70 75 80		Ala His		Gly Leu	Gln L		Gly Cy	ys Leu		Ala	
Company			-					•		0.1	
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu 35 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp 50 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr 80 Tyr Glo Thr Phe Phe Asn Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr 80 Tyr Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Tyr 75 Tyr 65	Ala	Leu Cys		Val His			Val Ph	ne Leu		GIn	
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp 50 Lys Gly Leu Arg Phe Glu Lys Lys Lys Ser Leu Glu Asp 65 Lys Thr	C 1	A.1 - A		1			A T. 1.	4.1 -		0.1	
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp 50	υIN		ser Leu	Leu GIN		val Arg	AIR II		ınr Ser	⊎ I U	
50 55 60 Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr 75 80	Тиг		Pho Dho	Acn Dra		The Dha	Clu Ca		C 1 11 A 1 2	Acn	
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr 65 70 75 80	1 y I		ing the		AIS I	тит тие			JIU AI A	чэh	
6 5 7 0 7 5 8 0	Cvc		Arg Pro		(, 1 n - I	velve			Asn Ive	Thr	
		от, пои	0 110		oru L	טנם טנב		Ju olu	и доги		
		Arg Glu	Leu Leu		Tyr I	lle Asp		rg Ile	Val Glu		

8 5

9 5

```
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
         100
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                         1 2 0
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
   130 135
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
            150
                                    155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
              1 6 5
                                170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asn Ile
                             185
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
      195
                         200
                                            205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                     2 1 5
                                        2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
     2 3 0
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                                250
              2 4 5
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
                 265
           260
                                                2 7 0
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
       2 7 5
                             285
                         280
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                     295
                                        3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305
                  3 1 0
                                    3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                          3 3 0
              3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
                                                350
           3 4 0
                             3 4 5
< 2 1 0 > 2 3
< 211> 1056
<212> DNA
< 2 1 3 >
      Homo sapiens
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
      CDS
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
< 223>
< 4 0 0 >
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5 1 0
                                                                 96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
           2.0
                             25
                                                3.0
```

												gcc				1 4 4
		3 5					4 0					Ala 45				
	Gln					Pro					Ser	gga Gly				192
t g t	50 ggg	c t g	сва	c c t	c t g	5 5 t t c	gag	a a g	aag	t c g	6 0 c t g	gag	gac	a a a	асс	2 4 0
Суs 65	Gly	Leu	Arg	Pro	L e u 7 0	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser 75	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr 80	
												att Ile				288
				8 5		,			9 0		,	,		95		0.00
			Glu					Pro				atg Met	Leu			3 3 6
aag	a ø t	ccc	100	ggg	ctø	ctø	t g t	105	a c c	200	ctc	a t c	1 1 0 a g t	gac	C g C	3 8 4
												I I e 1 2 5				0 0 1
t g g	g t c		асс	g c c	g c c	сас		c t c	c t g	t a c	ССВ	ССС	t g g	gac	aag	4 3 2
Trp	V a l 1 3 0	Leu	Thr	Ala	Ala	H i s 135	Суѕ	Leu	L e u	Туr	Pro 140	Pro	Trp	Asp	Lys	
												aag				4 8 0
Asn 145	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp 150	Leu	Leu	V a 1	Arg	11e 155	Gly	Lуs	His	Ser	Arg 160	
a c a	agg	t a c	gag	cga	a a c	a t t	gaa	a a g	a t a	$t\ c\ c$	a t g	t t g	gaa	a a g	a t c	5 2 8
Thr	Arg	Туr	Glu	Arg 165	Asn	I I e	Glu	Lys	II e 170	Ser	Met	Leu	Glu	L y s 175	I I e	
												gac				5 7 6
			180					185				Asp	190			
												gac				6 2 4
		195					200					A s p 2 0 5				4.5.0
												ttg Leu				6 7 2
110	2 1 0	0 1 2	ьси	110	дэр	215	Glu	1 11 1	АГа	ліа	220	ьси	ьси	GIII	лια	
												aag				7 2 0
6 F y 2 2 5	Iуr	Lys	6 I Y	Arg	v a 1 2 3 0	Inr	6 I y	lrp	GIY	A s n 2 3 5	Leu	Lys	61 U	Inr	1 r p 2 4 0	
												cag				7 6 8
				2 4 5					250			Gln		255		
												a c c				8 1 6
			260					265				Thr	2 7 0			
												gat				8 6 4
116	Ihr	A s p 2 7 5	Asn	Met	rne	СЛЗ	A I a 2 8 0	6 I y	ıyr	LÿS	7 7 0	A s p 2 8 5	6 I U	6 I y	LÿS	
												t t t P h e				9 1 2
111 6	OIJ	iro h	11 I U	∨ 1 2	oru	11 1 U	no p	11 1 U	013	017	110	1 11 6	, u 1	m (t	пίν	

```
290
                         295
                                              3 0 0
                                                                        960
ago coo ttt aac aac ogo tgg tat caa atg ggo ato gto toa tgg ggt
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                    3 1 0
                                         3 1 5
gaa ggc tgt gac cgg gat ggg aaa tat ggc ttc tac aca cat gtg ttc
                                                                       1008
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                3 2 5
                                     3 3 0
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag
                                                                      1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
                                                      350
< 2 1 0 > 2 4
<211> 351
\langle 2 1 2 \rangle PRT
<213> Homo sapiens
< 4 0 0 > 2 4
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                                     1.0
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                 25
            2.0
                                                      3 0
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                             4 0
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5 0
                        5 5
                                              6.0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
             7 0
                                         75
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                                    90
                8.5
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
                                105
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                    1 2 0
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                        1 3 5
                                             1 4 0
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
1 4 5
                    150
                                         155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                     170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                                185
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr lle His
                             2 0 0
       195
                                                  2 0 5
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                        2 1 5
                                              2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                             2 3 5
2 2 5
                2 3 0
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                    250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
```

The Thr Asp Ash Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys 275 280 285				260					2 6 5					2 7 0				
Are Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys 291 306	II e	Thr		Asn	M e t	P h e	Суѕ		G 1 y	Tyr	Lys	Pro		Glu	Gly	Lys		
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Cln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly 305 326	Arg		Asp	Ala	Суѕ	Glu			Ala	G 1 y	G 1 y			V a l	Met	Lys		
Clu Cly Cys Asp Arg Asp Cly Lys Tyr Cls Phe Tyr Thr His Val Phe 325 33				Asn	Asn			Туr	Gln	Met			V a l	Ser	Trp			
C		G 1 y	Суѕ	Asp			G 1 y	Lys	Tyr			Tyr	Thr	H i s				
C211	Arg	Leu	Lys			IIe	Gln	Lys			Asp	Gln	Phe		Glu			
C213																		
<2213> Homo sapiens <2220> (221) CDS <2222> (1) (1056) <223> <4400> 25 at geg cac gtc cga ggc ttg cag gct gg ctg ctg gct gg tgg ctg gcg ctg gct gg ctg gcg ctg gcg ctg gcg ctg gcg ctg gcg gac gg gcg gg gg gg ctg gcg gac gg gcg gac gg gcg gac gg gcg gg g																		
<pre></pre>				sap	i e n s													
<pre></pre>																		
<pre></pre>				(1.0.1	F & \													
Ala			(1)	(10)	J 0)													
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gly Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala 1 1 5 1 5 10 1 15 15 2 2 2 3 6 2 15 15 3 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4	< 4 0 0) >	2 5															
The content of the																	4 8	
Secondary Seco		Ala	His	Val		Gly	Leu	Gln	Leu		Gly	Суѕ	Leu	Ala		Ala		
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln Gln	_	ctg	tgt	agc		gtg	сас	agc	сав		gtg	t t c	ctg	gct		сав	9 6	
Case Are Case C				Ser					Gln					Ala				
Tack Cask Cack	саа	g c a	Сдд	t c g	c t g	\mathfrak{c} \mathfrak{t} \mathfrak{c}	сав	c g g	g t c	сдд	сва	асс	g с с	асс	a g t	gag	1 4 4	
Tyr Gln Thr Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Asp tgt ggg ctg cgg cct ctg ttc gag aag aag cgg ctg gag aag aag gag	Gln	Ala		Ser	Leu	Leu	Gln		Val	Arg	Arg	Thr		Thr	Ser	Glu		
The color The	t a c	c a g	$a\mathrel{c} t$	t t c	t t c	a a t	ссв	agg	асс	t t t	ggc	t c g	gga	gag	g c a	g a c	192	
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Leu Glu Asp Lys Thr 65	Tyr		Thr	Phe	Phe	Asn		Arg	Thr	P h e	G 1 y		Gly	Glu	Ala	Asp		
Record Fig. Fig.																	2 4 0	
gaa aga ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggg ggg cgc att gtg gag ggc 288 Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Glu Gly		G 1 y	Leu	Arg	Pro		P h e	Glu	Lys	Lys		Leu	Glu	Asp	Lys			
Ser Ser		aga	gag	ctc	ctg		t c c	tac	a t c	gac		свс	a t t	gtg	gag		288	
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg 100																		
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg 100					8 5					9 0					9 5			
100 105 110 384 Lys Gen Cts 105 110 384 Lys Gen Gen Cts Cts Gen Cts Cts Gen Cts Cts <th colsp<="" td=""><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>3 3 6</td></th>	<td></td> <td>3 3 6</td>																	3 3 6
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg 115	Ser	Asp	Ala		He	Gly	Met	Ser		lrp	GIn	v a I	Met		r h e	Arg		
tgg gtc ctc acc gcc gcc gcc tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys	a a g	a g t															3 8 4	
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys	Lys	Ser		Gln	Glu	Leu	Leu		G 1 y	Ala	Ser	Leu		Ser	Asp	Arg		
	t g g																4 3 2	
	Trp			Thr	Ala	Ala		Суѕ	L e u	Leu	Tyr		Pro	Trp	Asp	Lys		

						ctt										480
	P h e	Thr	GIu	Asn		Leu	Leu	V a I	Arg		Gly	Lуs	His	Ser		
145					150					155					160	
a c a						a t t									a t c	5 2 8
Thr	Arg	Туr	Glu	Arg	Asn	Пlе	Glu	Lуs	Пlе	Ser	Met	Leu	Glu	Lуs	Пlе	
				165					170					175		
t a c	a t c	сас	$C \; C \; C$	agg	t a c	аас	t g g	C g g	gag	a a c	\mathfrak{c} t g	gac	Cgg	gac	a t t	5 7 6
Туr	II e	His	Pro	Arg	Туr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Пe	
			180					185					190			
gcc	ctg	a t g	a a g	ctg	a a g	a a g	$c\ c\ t$	g t t	gcc	t t c	a g t	gac	t a c	a t t	сас	6 2 4
Ala	Leu	Met	Lуs	Leu	Lys	Lуs	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Asp	Туr	Ιlе	His	
		195					200					205				
c c t	gtg	t g t	c t g	ССС	gac	agg	gag	асв	gca	g c c	a g c	t t g	c t c	сав	gct	672
Pro	Val	Суѕ	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	2 1 0					2 1 5					2 2 0					
gga	t a c	aag	ggg	Сдд	gtg	аса	ggc	tgg	ggc	аас	ctg	aag	gag	acg	t g g	7 2 0
Gly						Thr										
2 2 5	- •	- •			2 3 0					2 3 5		- •			2 4 0	
	gcc	аас	gtt	ggt		ggg	cag	ССС	agt		ctg	cag	gtg	gtg	a a c	768
						Gly								Val		, , ,
				2 4 5	2,5	J.,	٠		250		Воч	0 I II		255		
ctg	ccc	a t t	gtg		Caa	ссв	gtc	t g c		gac	tcc	асс	Cgg	a t c	C g C	8 1 6
						Pro								I I e		010
Бой			260	014	11 1 0	110	, и 1	265	L , 5	тор	501		270	110	11 1 5	
a t c	a c t	gar		atσ	t t c	t g t	o c t		tac	ລ ລ σ	cct	σat		ggg	2 2 2	8 6 4
						Cys										0 0 1
116	1 11 1	275	11 5 11	IVICt	1 11 0	0,13	280	013	1 3 1	Гјз	110	285	oru	Oly	LβS	
c « n	n n n		a c c	+ a +	m n n			a c c			0.0.0		a t c	a t a	0 0 0	9 1 2
						ggg										912
AIE		A 2 b	АІа	0 1 2	GIU	295	A 2 h	Ald	GIY	Uly	300	THE	v a I	Met	Lys	
0 0 0	290	+ + +	0.0.0	0.0.0	0.00		t o t	0.0.0	o t a			a t o	t c o	t a a	a a +	960
						t g g										900
	110	rne	A 5 II	A S II		Trp	ΙΫ́Ι	6 I II	wet		116	v a I	261	111		
3 0 5		1 1			3 1 0			1.1		3 1 5	4				3 2 0	1 0 0 0
						ggg									t t c	1008
GIU	61 y	Cys	ASP		ASP	Gly	LÿS	ıyr		rne	ıyr	ınr	HIS		rne	
				3 2 5	,				3 3 0	,				3 3 5	1	1 0 5 0
						cag									t a g	1 0 5 6
Arg	Leu	Lуs		Trp	Пе	Gln	Lys		Пе	Asp	GIn	Phe		Glu		
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			
< 21 (26														
< 2.1		3 5 1														
< 2 1 2		PRT														
< 2.1.3	3> [Homo	sap	i e n s												
,		0.0														
) >				a -						~					
	Ala	His	V a l		Gly	Leu	GIn	Leu		Gly	Суѕ	Leu	Ala		Ala	
1	_	~	~	5		•••	~	~ -	1 0					15		
Ala	Leu	Суѕ	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	V a l	P h e	Leu	Ala	Pro	Gln	

3 0

2 0

```
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        35
                            4 0
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                        5 5
                                            6 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
     7 0
                                       75
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
                8.5
                                    90
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            1 0 0
                                1 0 5
                                                    1 1 0
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
        1 1 5
                            1 2 0
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
   130
                       1 3 5
                                            140
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                    150
                                        155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                                   170
               165
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                  185
           180
                                                    190
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
       195
                            2 0 0
                                                205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                        2 1 5
                                            2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                    2 3 0
                                        2 3 5
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                    250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        2 7 5
                            280
                                                285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                       295
                                            3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
305
                  3 1 0
                         3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                        3 3 0
                3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                3 4 5
                                                     350
< 2 1 0 >
       2.7
< 211>
      1056
< 2 1 2 >
       DNA
< 213>
      Homo sapiens
```

< 2 2 0 > < 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 >

CDS

(1)...(1056)

< 4 0 0) > 2	7														
	gcg		gtc	C g a	ggc	t t g	cag	ctg	c c t	ggc	t g c	ctg	g C C	ctg	get	4 8
	Ala I															. •
1	711 0 1	1115	, 1	5	V.,	D v u	0111	D · u	10	V.,	Ų, b	Боч	71 1 0	15		
gcc	ctg	tgt	agc		gtg	сас	agc	сад		gtg	t t c	ctg	gct		сав	9 6
	Leu															
	2 0 4		2 0	2			~ .	25			0	200	3 0	• • •	·	
саа	g c a	Cgg		ctg	ctc	cag	Cgg		Cgg	cga	асс	g c c		agt	gag	1 4 4
	Ala .															111
0111		35	501	Воч	Боч	0111	4 0	,	4110			4 5	1 11 1	501	o i u	
tac	сав		t t c	t t c	aat	CCg		асс	t t t	ggr	t c g		gag	gca	gac	192
	Gln '															1 0 2
. , .	5 0		1 11 0	1 11 0	71 0 11	55	111 0		1 11 0	01,	60	01,	0 I u	711 0	11 5 P	
t ø t	ggg	ctø	C g A	cct	ctø		gag	аав	aag	t c g		gag	gac	2 2 2	a c c	2 4 0
	Gly I															210
65	01)	L v u	11.1.0	110	7 0	1 11 0	oru	L , 5	ц	7 5	ьси	oru	изр	Бјз	8 0	
	aga.	ggg	ctc	cts		t c c	tac	a t c	gar		coc	a t t	g t g	ggg		288
	Arg															200
oru	11.1.6	oru	ьси	8 5	oru	501	1) 1	110	90	013	1116	110	v u i	9 5	01)	
t c o	gat.	o c a	σασ		ggr	atσ	t c a	c c t		cag	σtσ	atσ	ctt		C a a	3 3 6
	Asp															000
501	пор	n i a	100	110	013	IVICt	501	105	1 1 p	0111	* a 1	IVI C t	110	1 11 0	11 1 8	
aag	a g t	C C C		σασ	c t o	ctσ	t o t		g c c	200	ctc	a t c		gac	c o c	3 8 4
	Ser 1															0 0 1
цз		115	0111	oru	ьcu	ьси	120	01,	πια	501	Lcu	125	DUI	изр	11 1 8	
t σ σ	gtc		200	o c c	o c c	626		ctc	c t o	tac	cco		tσσ	gac	α α σ	4 3 2
	Val 1															102
1111	130	Lсu	1 11 1	ЛΙα	лια	135	013	ьси	ьси	1) 1	140	110	111	лэр	ГΊЗ	
226	ttc	200	σασ	aat	gar		c t o	σtσ	c a c	att		2 2 0	cac	tee	c o c	480
	Phe '															100
145	1110	1 11 1	oru	11 2 11	150	Lcu	ьсu	v a i	111 8	155	01,	Цјз	1112	DCI	160	
	agg	tac	σασ	c o a		a t t	σαα	σαα	a t a		atσ	ttσ	σαα	α α σ		5 2 8
	Arg '															0.20
1 11 1	ЛΙδ	1) 1	oru	165	Пэп	110	Olu	Olu	170	501	IVICt	ьси	Olu	175	110	
tac	a t c	C 2 C	C C C		tac	226	t a a	c a a		226	c t a	gar	c a a	gac	a t t	5 7 6
	lle 1															010
1 3 1	116	1119	180	11 1 8	1 1 1	11 5 11	111	185	oru	11 2 11	ьсu	нар	190	нор	110	
0.0.0	ctg	atσ		c t a	2 2 0	2 2 0	cct		g c c	ttc	aσt	gar		a t t	C 2 C	6 2 4
A l a						Lys										0 4 4
πια		195	Гјз	Lсu	гіз	Гіз	200	v a 1	ЛΙα	Inc	9 C I	205	1) 1	110	11 1 2	
cct	gtg		c t a	0.0.0	m a c	2 0 0		2 C U	a c a	a c c	200		ctc	can	a e t	672
	Val															012
110	210	U y S	ьеи	110	A 2 h	215	viu	1 11 1	АГа	АІа		ьеи	Leu	UIII	АТа	
0 0 0		11 11		e a a	a t a		a a c	t a a	a a e	996	2 2 0	9 9 6	0 0 0	9 0 0	t a a	7 2 0
	t a c											a a g				1 2 0
	Tyr	г % 2	υIÿ	AIS	2 3 0	1 II I	υIÿ	111	υIÿ	2 3 5	ьeu	г й 2	บเน	1 11 1	1 r p 2 4 0	
225	m e e	112	a + +	a a 4		u	C 0 "	000	2 a t		c t a	r n «	a t a	a t a		768
	g C C														a a c	100
1 11 1	Ala	₩ 2 II	v a I		гλ?	υI)	υIll	1 1 0		v a I	ьеu	υIll	v a I		W 2 II	
				2 4 5					250					2 5 5		

ctg ccc att								
Leu Pro Ile	260		265			270	lle Ar	
atc act gac lle Thr Asp 275							ggg aa Gly Ly	
		gaa gct Glu Ala	gac ggg		ccc ttt			
290 agc ccc ttt		2 9 5			3 0 0			
Ser Pro Phe 305								у
gaa ggc tgt Glu Gly Cys								
cgc ctg aag	325 aag tgg		aag gtc	330 att gat	cag ttt		335 gag ta	g 1056
Arg Leu Lys	Lys Trp 340	Ile Gln	Lys Val 345	Ile Asp	Gln Phe	G 1 y 3 5 0	Glu	
<210> 28 <211> 351 <212> PRT								
	s a p i e n s							
< 4 0 0 > 2 8								
Met Ala His	Val Arg 5	Gly Leu	Gln Leu	Pro Gly	Cys Leu		Leu Al 15	a
Met Ala His	5 Ser Leu		Ser Gln	10 His Val	Phe Leu	Ala	15	
Met Ala His I	5 Ser Leu 20	Val His	Ser Gln 25	10 His Val	Phe Leu	A 1 a 3 0	15 Pro Gl	n
Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg	Ser Leu 20 Ser Leu	Val His Leu Gln	Ser Gln 25 Arg Val 40	10 His Val Arg Arg	Phe Leu Thr Ala 45	A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Gl Ser Gl	n u
Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60	Ala 30 Thr	15 Pro Gl Ser Gl Ala As	n u p
Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu	Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Gl Ser Gl Ala As Lys Th 80	n u p
Met Ala His l Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85 Glu Ile	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys Tyr Ile Ser Pro	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75 Asp Gly 90	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu Arg Ile Val Met	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu	15 Pro Gl Ser Gl Ala As Lys Th 80 Glu Gl 95	n u p r
Met Ala His I Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85 Glu Ile	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys Tyr Ile Ser Pro 105 Cys Gly	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75 Asp Gly 90 Trp Gln	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu Arg Ile Val Met	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110	15 Pro G1 Ser G1 A1a As Lys Th 80 G1u G1 95 Phe Ar	n u p r y
Met Ala His 1 Leu Cys Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Thr Thr 50 Leu 65 Leu Glu Arg Glu Ser Ala Lys Ser Pro 115 Trp Val	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85 Glu Ile 100 Gln Glu Thr Ala	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met Leu Leu	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys Tyr Ile Ser Pro 105 Cys Gly 120 Cys Leu	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75 Asp Gly 90 Trp Gln Ala Ser	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu Arg Ile Val Met Leu Ile 125	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro G1 Ser G1 A1a As Lys Th 80 G1u G1 95 Phe Ar	n u p r y g
Met Ala His 1 Leu Cys Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Thr Thr 50 Leu 65 Leu Glu Arg Glu Ser Ala Lys Ser Pro 115 Trp Val	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85 Glu Ile 100 Gln Glu Thr Ala	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met Leu Leu Ala His 135 Asp Leu	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys Tyr Ile Ser Pro 105 Cys Gly 120 Cys Leu	10 His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75 Asp Gly 90 Trp Gln Ala Ser Leu Tyr	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu Arg Ile Val Met Leu Ile 125 Pro Pro	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro G1 Ser G1 A1a As Lys Th 80 G1u G1 95 Phe Ar Asp Ly	n u p r y g g g s
Met Ala His 1 Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Leu 65 Gly Leu 61 Arg Glu Ser Asp Ala Lys Ser Pro 115 Leu Asn Phe Thr	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85 Glu Ile 100 Gln Glu Thr Ala Glu Asn	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met Leu Leu Ala His 135 Asp Leu 150 Asn Ile	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys Tyr Ile Ser Pro 105 Cys Gly 120 Cys Leu Leu Val	His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75 Asp Gly 90 Trp Gln Ala Ser Leu Tyr Arg lle 155 Ile Ser	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu Arg Ile Val Met Leu Ile 125 Pro Pro 140 Gly Lys	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser Trp His	15 Pro G1 Ser G1 Ala As Lys Th 80 G1u G1 95 Phe Ar Asp Ly Ser Ar 16	n u p r y g g g g o
Met Ala His 1 Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Leu 65 Gly Leu 61 Arg Glu Ser Pro 115 Trp Val Leu 130 Asn Phe Thr 145 Thr Thr Thr	Ser Leu 20 Ser Leu Phe Phe Arg Pro Leu Leu 85 Glu Ile 100 Gln Glu Thr Ala Glu Asn Glu Arg 165 Pro Arg	Val His Leu Gln Asn Pro 55 Leu Phe 70 Glu Ser Gly Met Leu Leu Ala His 135 Asp Leu 150 Asn Ile	Ser Gln 25 Arg Val 40 Arg Thr Glu Lys Tyr Ile Ser Pro 105 Cys Gly 120 Cys Leu Leu Val Glu Glu Trp Arg	His Val Arg Arg Phe Gly Lys Ser 75 Asp Gly 90 Trp Gln Ala Ser Leu Tyr Arg lle 155 Ile Ser 170	Phe Leu Thr Ala 45 Ser Gly 60 Leu Glu Arg Ile Val Met Leu Ile 125 Pro Pro 140 Gly Lys Met Leu	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser Trp His	15 Pro G1 Ser G1 A1a As Lys Th 80 G1u G1 95 Phe Ar Asp Ar Asp Ly Ser Ar 16 Lys I1	n u p r y g g s o e

```
195
                           200
                                              205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                                          2 2 0
    2 1 0
                       2 1 5
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                   2 3 0
                                      2 3 5
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
               2 4 5
                                  250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
           260 265
                                                  2.7.0
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
       2 7 5
                          280
                                      285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Gly Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
       2 9 5
                                          3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
           3 1 0
                            3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
               3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
           3 4 0
                               3 4 5
                                                  350
< 2 1 0 > 2 9
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
< 2 2 2 >
     (1)...(1056)
< 2 2 3 >
<400> 29
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                  48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
               5
                          1 0
                                                                   96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                               25
           2.0
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                   1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
       3.5
                          40
                                  4.5
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                  192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
   5.0
      5.5
                                          6.0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                   2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                   7.0
6.5
                                      7.5
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                  288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
               85
                                  90
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
                                                                  3 3 6
```

Ser	Asp	Ala		I 1 e	G 1 y	Met	Ser		Trp	Gln	V a l	Met		Phe	Arg	
	4		100		. 4	. 4	1 1	105			. 4 .		110			204
												atc		gac		3 8 4
Lys	5 e r		GIN	GIU	Leu	Leu		GIY	Ala	5 e r	Leu	I l e	5 e r	ASD	Arg	
		115					1 2 0	. 4 .	. 4	4.0.0		1 2 5	4	** 6 3		120
		ctc												gac		4 3 2
rp	v a 1 1 3 0	Leu	ınr	AIa	AIa	H 1 S	СУS	Leu	Leu	lyr	140	Pro	irp	ASD	LYS	
аас	t t c	асс	gag	a a t	gac	ctt	ctg	gtg	СВС	a t t	ggc	aag	сас	t c c	СВС	480
Asn												Lys				
1 4 5					150					155					1 6 0	
аса	agg	t a c	gag	сва	аас	a t t	gaa	gaa	a t a	t c c	a t g	t t g	gaa	aag	a t c	5 2 8
Thr	Arg	Туr	Glu	Arg	Asn	Пе	Glu	Glu	Пlе	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Пlе	
				165					170					175		
t a c	a t c	сас	ССС	agg	t a c	аас	tgg	Сдд	gag	аас	ctg	gac	Сдд	аас	a t t	5 7 6
												Asp		Asn	Пlе	
·			180		,		-	185				•	190			
gcc	ctg	atg	aag	ctg	aag	aag	c c t		gcc	t t c	a g t	gac	t a c	a t t	сас	6 2 4
												Asp				
		195	_ , -		_ ,	_ , -	200					205				
c c t	gtg		c t g	ссс	gac	agg	gag	асв	gca	gcc	agc	t t g	ctc	сав	g c t	672
												Leu				
	2 1 0	•				2 1 5					2 2 0					
gga		aag	ggg	Сдд	gtg		ggc	t g g	ggc	аас		aag	gag	асд	t g g	7 2 0
												Lys				
2 2 5		2, -	· • •	0	2 3 0			,		2 3 5	2	_, -			2 4 0	
	gcc	аас	gtt	g g t		ggg	сая	ССС	a g t		ctg	сав	gtg	gtg	аас	768
Thr												Gln			Asn	, , ,
1 11 1	77.7 %			2 4 5	יים	Ŭ.,	o . n		250		D o u	o		255		
ctg	ССС	a t. t.	gtg		Сдд	сся	gtc	t g c		gac	t c c	асс	сдд		сяс	8 1 6
												Thr		I l e		•••
			260		0			265	-,-				2 7 0			
a t c	a c t	gac	аас	a t g	t t c	t g t	gct	g g t	t a c	aag	c c t	gat	gaa	ggg	a a a	8 6 4
	Thr											Asp		Gly	Lys	
		2 7 5					280					285				
сда	ggg	gat	gcc	t g t	gaa	gct	gac	gct	ggg	gga	ССС	t t t	gtc	a t g	aag	9 1 2
Arg	G 1 y											Phe				
	290	-		•		295					3 0 0				•	
agc	ССС	t t t	аас	аас	С g С	tgg	t a t	саа	a t g	g g C	a t c	g t c	t c a	t g g	ggt	960
												V a l			Gly	
3 0 5					3 1 0	•	•			3 1 5				•	3 2 0	
	ggc	t g t	gac	Сдд	gat	ggg	a a a	t a t	ggc	t t c	t a c	аса	cat	gtg	t t c	1008
												Thr		Val		
	*	•	•	3 2 5	•	*	•	• -	3 3 0	-	• -	-		3 3 5	-	
СВС	ctg	aag	aag		a t a	сав	aag	gtc		gat	сав	ttt	gga	gag	t a g	1056
												Phe			-	
ŭ		•	3 4 0		-		•	3 4 5	-	•		-	350			

<400> 30 Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala 5 1.0 Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln 2.5 Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu 35 4 0 4.5 Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr 7.0 65 75 Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly 8.5 9.0 Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg 1 0 0 105 Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg 1 2 0 115 125 Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys 1 3 5 1 4 0 Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg 150 155Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Glu Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile 165 170 Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asn Ile 180 185 190 Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His 200 205 Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala 2 1 0 2 1 5 2 2 0 Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp 2 3 0 235 Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn 2 4 5 250 Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg 265 260 lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys 285 2 7 5 280 Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys 295 3 0 0 Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly 3 1 0 3 1 5 Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe 3 3 0 3 2 5 Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu 3 4 0 350 3 4 5

```
<211> 1056
<212> DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 2 \ 2 \ 2 \rangle (1).. (1056)
< 2 2 3 >
<400> 31
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                               4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
1 5
                                                                96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
          20 25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                               144
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
       35
                         4 0
                                            45
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                               192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                     5 5
                                        6.0
                                                               2 4 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
6 5 7 0 7 5
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                               288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
              8.5
                                 9 0
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
                                                               3 3 6
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
              105
   1 0 0
                                                               384
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
           1 2 0
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                               4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                     1 3 5
                                        1 4 0
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc
                                                               480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
   150
                      155
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc
                                                               5 2 8
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
              165 170 175
                                                               5 7 6
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
              185
           180
gcc ctg atg aag ctg aag aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac
                                                               624
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                         2 0 0
                             2 0 5
cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct
                                                               6 7 2
```

Pro Val Cys 210	Leu	Pro	Asp	Arg 215	Glu	Thr	Ala	Ala	S e r 2 2 0	Leu	Leu	Gln	Ala	
gga tac aag	ggg	c g g	g t g	аса	ggc	t g g	ggc	аас	c t g	aag	gag	acg	t g g	7 2 0
Gly Tyr Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
2 2 5			2 3 0					2 3 5					2 4 0	
aca gcc aac	g t t	g g t	aag	ggg	сав	ССС	a g t	g t c	c t g	сав	g t g	g t g	аас	768
Thr Ala Asn	V a l	Gly	Lys	Gly	Gln	Pro	Ser	Val	Leu	Gln	V a l	V a l	Asn	
		2 4 5					250					255		
ctg ccc att	g t g	gag	Сдд	ссв	g t c	t g c	aag	gac	t c c	асс	Сдд	a t c	C g C	8 1 6
Leu Pro Ile														
	260					265					270			
atc act gac	аас	a t g	t t c	t g t	gct	g g t	t a c	aag	c c t	gat	gaa	ggg	a a a	8 6 4
lle Thr Asp														
2 7 5				•	280	•	•	- •		285		•	- •	
	gcc	tgt	gaa	g c t		agt	ggg	gga	ССС		gtc	atg	aag	9 1 2
Arg Gly Asp														
290		0,2	• • •	295	р	~ .	·.,	•••	3 0 0				2,,	
agc ccc ttt	аас	аас	C g C		tat	caa	atg	ggc		gtc	t c a	t g g	g g t	960
Ser Pro Phe														
3 0 5			3 1 0		. , .	o	<i>III</i> 0 0	3 1 5			~ 0 .		3 2 0	
gaa ggc tgt	gac	Caa		ggg	2 2 2	t a t	ggc		t a c	аса	cat	g t g		1008
Glu Gly Cys														1000
		3 2 5					3 3 0					3 3 5		
cgc ctg aag													t a g	1 0 5 6
Arg Leu Lys	Lys	Trp	Пlе	Gln	Lys	V a l	Пlе	Asp	Gln	Рhе	Gly	Glu		
	3 4 0					3 4 5					3 5 0			
< 2 1 A > 3 2	3 4 0					3 4 5					350			
<210> 32 <211> 351	3 4 0					3 4 5					350			
< 2 1 1 > 3 5 1	3 4 0					3 4 5					350			
< 2 1 1 > 3 5 1 < 2 1 2 > P R T		Anc				3 4 5					350			
<211> 351 <212> PRT <213> Homo		e n s				3 4 5					350			
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32</pre>	sapi													
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His</pre>	sapi	Arg	Gly	L e u	Gln			G 1 y	Суѕ	L e u			Ala	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1</pre>	s a p i V a l	Arg 5				L e u	1 0				Ala	15		
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His</pre>	sapi Val Ser	Arg 5				Leu Gln	1 0				Ala Ala	15		
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1</pre>	s a p i V a l	Arg 5				L e u	1 0				Ala	15		
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	sapi Val Ser 20	Arg 5 Leu	V a l	His	Ser	L e u G 1 n 2 5	l 0 H i s	V a l	P h e	Leu	A 1 a A 1 a 3 0	15 Pro	Gln	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys</pre>	sapi Val Ser 20	Arg 5 Leu	V a l	His	Ser	L e u G 1 n 2 5	l 0 H i s	V a l	P h e	Leu	A 1 a A 1 a 3 0	15 Pro	Gln	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	sapi Val Ser 20 Ser	Arg 5 Leu Leu	V a l L e u	His Gln	Ser Arg 40	L e u G l n 2 5 V a l	1 0 H i s A r g	Val Arg	Phe Thr	L e u A 1 a 4 5	A 1 a A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser	Gln Glu	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35</pre>	sapi Val Ser 20 Ser	Arg 5 Leu Leu	V a l L e u	His Gln	Ser Arg 40	L e u G l n 2 5 V a l	1 0 H i s A r g	Val Arg	Phe Thr	L e u A 1 a 4 5	A 1 a A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser	Gln Glu	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr</pre>	s api Val Ser 20 Ser	Arg 5 Leu Leu Phe	V a l L e u A s n	His Gln Pro 55	Ser Arg 40 Arg	Leu Gln 25 Val	l 0 H i s A r g P h e	Val Arg Gly	Phe Thr Ser 60	Leu Ala 45 Gly	A 1 a A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser Ala	Gln Glu Asp	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50</pre>	s api Val Ser 20 Ser	Arg 5 Leu Leu Phe	V a l L e u A s n	His Gln Pro 55	Ser Arg 40 Arg	Leu Gln 25 Val	l 0 H i s A r g P h e	Val Arg Gly	Phe Thr Ser 60	Leu Ala 45 Gly	A 1 a A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser Ala	Gln Glu Asp	
<pre> <211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe	Arg 5 Leu Phe Pro	Val Leu Asn Leu 70	His Gln Pro 55 Phe	Ser Arg 40 Arg	Leu Gln 25 Val Thr	10 His Arg Phe Lys	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60 Leu	Leu Ala 45 Gly	Ala Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys	G 1 n G 1 u A s p T h r 8 0	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe	Arg 5 Leu Phe Pro	Val Leu Asn Leu 70	His Gln Pro 55 Phe	Ser Arg 40 Arg	Leu Gln 25 Val Thr	10 His Arg Phe Lys	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60 Leu	Leu Ala 45 Gly	Ala Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys	G 1 n G 1 u A s p T h r 8 0	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe Arg	Arg 5 Leu Phe Pro Leu 85	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr	L e u G 1 n 2 5 V a 1 Th r L y s I 1 e	1 0 H i s A r g P h e L y s A s p 9 0	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu	A 1 a A 1 a 3 0 T h r G 1 u A s p	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95	G l n G l u A s p T h r 8 0 G l y	
<pre><211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe Arg	Arg 5 Leu Phe Pro Leu 85	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr	L e u G 1 n 2 5 V a 1 Th r L y s I 1 e	1 0 H i s A r g P h e L y s A s p 9 0	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu	A 1 a A 1 a 3 0 T h r G 1 u A s p	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95	G l n G l u A s p T h r 8 0 G l y	
<pre> <211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu Ser Asp Ala</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100	Arg 5 Leu Phe Pro Leu 85	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser	Leu Gln 25 Val Thr Lys Ile Pro 105	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	Ala Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
<211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu Ser Asp Ala Lys Ser Pro	sapi Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100	Arg 5 Leu Phe Pro Leu 85	Val Leu Asn Leu 70 Glu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys	Leu Gln 25 Val Thr Lys Ile Pro 105	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	Ala Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
<pre> <211> 351 <212> PRT <213> Homo <400> 32 Met Ala His 1 Ala Leu Cys Gln Ala Arg 35 Tyr Gln Thr 50 Cys Gly Leu 65 Glu Arg Glu Ser Asp Ala</pre>	sapi Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln	Arg 5 Leu Phe Pro Leu 85 Ile Glu	Val Leu Asn Leu 70 Glu Leu	His Gln Pro 55 Phe Ser Met Leu	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120	L e u G l n 2 5 V a l T h r L y s I l e P r o 1 0 5 G l y	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125	Ala Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg	

```
130
                        1 3 5
                                            1 4 0
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
1 4 5
                    150
                                        155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                   170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
           180
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                            2 0 0
                                                 205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
    2 1 0
                2 1 5
                                             2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                        2 3 5
                    2 3 0
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                    250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                265
                                                     2 7 0
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        2 7 5
                            280
                                                 285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Ala Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
    290
                        295
                                             300
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                                        3 1 5
                    3 1 0
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                3 2 5 3 3 0 3 3 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                3 4 5
                                                     350
< 2 1 0 > 3 3
< 2 1 1 > 1 0 5 6
< 2 1 2 > DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 2 \ 2 \ 2 \rangle (1).. (1056)
< 2 2 3 >
\langle 4 \ 0 \ 0 \rangle \qquad 3 \ 3
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                      4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                     1 0
                5
                                                                       96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            2 0
                                25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                      1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                            4 0
                                                 4.5
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                      192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
```

	5 0					5 5					6 0					
t g t		ctg	C g A	cct	ctg	ttc	8 9 8	aag	aag	t c g		8 Y 8	gac	ааа	асс	2 4 0
Сус						Phe									Thr	210
6 5					7 0			_ •	_ •	7 5				- •	8 0	
gaa	aga	gag	c t c	c t g	gaa	t c c	t a c	a t c	gac	ggg	СВС	a t t	gtg	gag	ggc	288
Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Glu	Ser	Туr	I I e	Asp	Gly	Arg	Пе	Val	Glu	Gly	
				8 5					9 0					9 5		
						a t g								t t c	c g g	3 3 6
Ser	Asp	Ala		Пlе	G 1 y	Met	Ser		Trp	Gln	V a l	Met		Phe	Arg	
			1 0 0		,			105				,	110			2.0.4
aag						ctg										3 8 4
Lys	5 e r	115	GIN	GIU	Leu	Leu	120	GIY	Ala	5 e r	Leu	1 1 e 1 2 5	s e r	ASD	Arg	
t g g	gtc		200	o c c	o c c	g C C		ctc	c t o	tac	cco		tσσ	gac	2 2 0	4 3 2
						Ala										102
1 1 p	1 3 0	Воч		711 0	711 4	135	0,5	D v u	Боч	. , .	140			11 5 р	D, J	
аас	t t c	асс	gag	a a t	gac	ctt	ctg	gtg	свс	a t t		aag	сас	t c c	свс	480
Asn	Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	V a l	Arg	I 1 e	Gly	Lys	His	Ser	Arg	
145					150					155					160	
аса	agg	t a ε	gag	сва	аас	a t t	g a a	a a g	a t a	$t\ c\ c$	a t g	t t g	gaa	a a g	a t c	5 2 8
Thr	Arg	Tyr	Glu		Asn	Пe	Glu	Lys		Ser	Met	Leu	Glu		Ilе	
				165					170					175		5.5.0
						a a c								gac	att	5 7 6
ı y r	1 I e	HIS	180	Arg	Iуr	Asn	irp	Arg 185	GIU	Asn	Leu	ASP	Arg 190	Asp	1 1 e	
g c c	c t o	atσ		c t a	2 2 0	a a g	cct		a c c	t t c	aσt	gac		a t t	C 2 C	6 2 4
						Lys										0 2 1
71 1 0	Боч	195	L, 0	Бой	Бјо	Б,5	200		71 1 0	1 11 0	501	205	. , .	110	11 1 5	
cct	gtg		ctg	ССС	gac	agg		a c g	gca	gcc	a g c		ctc	сав	gct	672
Pro	V a l	Суѕ	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	2 1 0					2 1 5					2 2 0					
gga	t a c	aag	ggg	C g g	g t g	a c a	ggc	t g g	ggC	аас	c t g	a a g	gag	a c g	t g g	7 2 0
	Туr	Lуs	Gly	Arg		Thr	Gly	Trp	Gly		Leu	Lys	Glu	Thr		
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	5.0.0
						ggg									a a c	7 6 8
Inr	Ala	ASII	vai	6 I y 2 4 5	Lys	Gly	GIN	rro	5 e r 2 5 0	vai	Leu	GIN	vai	2 5 5	Asn	
c t a	C C C	att	σtσ		c o o	ссв	σ t c	t o c		σας	tcc	a.c.c	c o o		СВС	8 1 6
						Pro										010
D • •			260	٠. u	0			265		. г. э. р	~ • •		270		0	
a t c	a c t	gac	аас	a t g	t t c	t g t	g c t	g g t	t a c	aag	c c t	gat	gaa	ggg	a a a	8 6 4
Пlе	Thr	Asp	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly	Туr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	
		2 7 5					280					285				
сва						ggg										9 1 2
Arg		Asp	Ala	Сус	Glu	Gly	Asp	G 1 y	Gly	Gly		P h e	Val	Me t	Lys	
	2 9 0					295					3 0 0		4	4		Α Α Α
						t g g Trn										960
Ser 305	110	гпе	ASD	A S II	Arg 310	Trp	ıyr	υIN	wet	3 1 5	1 1 e	v a I	ser	1 []	3 2 0	
	gge	t g t	gar	Caa		ggg	2 2 2	t a t	ggr		tac	2 (2	cat	g f g		1008
ьии	886	ιδί	but	∪ 6 6	δαι	0 0 0	uuu	ιαι	001		ιαι	uva	υαι	018		1 // 0

```
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                     3 3 0
                3 2 5
cgc ctg aag aag tgg ata cag aag gtc att gat cag ttt gga gag tag 1056
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                                 3 4 5
< 2 1 0 > 3 4
<211> 351
< 2 1 2 > PRT
<213> Homo sapiens
< 4 0 0 >
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                    1 0
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                 2.5
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        35
                            4 0
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                        55
                                             6 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                7 0
                                        7.5
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                8 5
                                     90
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
                                105
           1 0 0
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                            1 2 0
        115
                                                 1 2 5
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                        1 3 5
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
1 4 5
                    150
                                        155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                    170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
           180
                    185
                                                    190
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr lle His
                            200
                                                 205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
    2 1 0
                        2 1 5
                                             2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                    230
                                        235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                     250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                 265
                                                     270
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
                            280
        2 7 5
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Gly Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
```

295

3 0 0

```
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
    3 1 0 3 1 5
305
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                    3 3 0
               3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
               3 4 5
           3 4 0
                                                 350
< 2 1 0 > 3 5
<211> 1056
< 2 1 2 > DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
<221> CDS
\langle 2 \ 2 \ 2 \rangle (1).. (1056)
< 223>
<400> 35
                                                                 48
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
               5
                   1 0
                                                                  96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
           2 0
                              25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                 1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
       3 5 4 0
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                 192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                      5.5
                                         6.0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                 2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
         7 0
                       7 5
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                 288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
               8 5
                      9 0
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
                                                                 3 3 6
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
                  1 0 5
           1 0 0
                                                 1 1 0
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
                                                                 384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
           1 2 0
tgg gtc ctc acc gcc gcc tcc tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                 4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ser Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
              1 3 5
                                         1 4 0
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc
                                                                 480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                  150
                                     155
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc
                                                                 5 2 8
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
```

		1.6	ī.		170			1.7	ŗ.	
t 0 0	0 + 0 0 0 0			o + a a		000 010	<i>(</i> , 0, 0	17		5.7.c
			g tac aa							5 7 6
I y I	пе пт	180	g Tyr As		185	ASII Leu		190	p rre	
u c c	eta ata					tte aat			t cac	6 2 4
			g aag aa							0 4 4
AId	195	гаг ге	u Lys Ly	200 v	val Ala		205	1 9 1 1 1	е птэ	
c c t		cta cc				a c c - 2 a c		ctc ca	a act	672
			C gac ag							0 1 2
110	210	Leu II	o Asp Ar 21		IIII AId	220		Leu Gi	II AI a	
					taa aac			m n m n n n	a taa	7 2 0
gga			ggtgac gVal Th					gag ac		1 4 0
225	I) I L) S	GI) AI:	230	т отут		235	Г 1, 2	GIU III	240	
	m c c 2 2 2 c	att aa		a cha c	ece nat		c 1 "	ata at		768
			taag gg y Lys Gl							7 0 0
1 11 1	Ald ASII	24		y GIH I	250	val Leu	GIII	2 5		
e t a	ccc att			a ate t		and too	0.0.0			816
			g Cgg CC							010
ьеи	110 116	260	u Arg Pr		уз цуз 265	Wah per	1 11 1	270	C AIG	
n t c	act asc		a tte ta			ana cet	a a t		« 111	864
			g ttc tg							004
116	275	W 2 II IAI G	t Phe Cy	280	1	L 3 2 1 1 0	285	viu vi	у Гу5	
0 0 0		acc ta	t ann aa					ata ot	« 0 0 «	9 1 2
сgа Arg	ggg gat		t gaa gg					gtc at		9 1 2
AIg	290	Ald Cy	s Glu Gl 29		ild Gly	300	1 11 6	val We	г гуз	
agc		116 11	c cgc tg		enn nta		a t c	ten ta	a a a t	960
•			n Arg Tr							3 0 0
305	IIO INC	лэн лэ	310	pryr (TIII MET	315	v a i	nei II	320	
	aac tat	0 2 C C 0	g gat gg	a aaa t	tat aac		2 (2	cat of		1008
			g Asp Gl							1000
Glu	011 013	3 2 1		у Буз і	330		1 11 1	33		
c o c	cto aao		gata ca	σ αασ σ		oat cao	t t t			1056
			plle Gl							1000
ЛΙδ	Lcu Ljs	3 4 0	p iic di		3 4 5	Mah ain	1 11 0	350	u	
		UTV		·	7 7 7			000		
< 2 1 () > 36									
< 2 1										
< 2 1 2										
< 213		sapien	2							
(2 1 (, 11 v III v	5 u p I o II	J.							
< 4 0 () > 36									
		Val Ar	g Gly Le	u Gln I	eu Pro	Glv Cvc	I, e 11	Ala Le	u Ala	
		5	0 01, 110	~ JIII L	10	J., 0,5	_ o u	15	w	
•	Len Cvs		u Val Hi	s Ser (Val Phe	L, e 11		o (; 1 n	
1. 1 U	204 013	20	w. 111		25	. wi iii	_ ou	30	· • 111	
(_r 1 n	Ala Arø		u Leu Gl			Arg Thr	Ala		r (, 1 11	
0 I II	35			40	. ~ 1 11 5	0 1 11 1	4 5		. 014	
Tvr		Phe Ph	e Asn Pr		Chr Phe	Glv Ser		Glu Al	a Asp	
٠, ١	50	0 1 11	5 5			60	~	w (11	w p	
					_	~ .				

Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr

```
6.5
                   7.0
                                      7.5
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                                  9.0
               8 5
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
       100
                              105
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
               1 2 0
       1 1 5
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ser Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
       1 3 5
                                          1 4 0
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                 150
                          155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
               165
                                  170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                   185
       180
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                           200
       195
                                              205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                       2 1 5
                                          2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
225
                   2 3 0
                                      235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
               2 4 5
                                   250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
               265
           260
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
       2 7 5
                           280
                                              285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
   2 9 0 2 9 5
                                          3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                       3 1 5
                  3 1 0
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                      3 3 0
               3 2 5
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
                                                  350
           3 4 0
                               3 4 5
\langle 2 1 0 \rangle = 3 7
< 2 1 1 >
     1056
<212> DNA
< 2 1 3 >
      Homo sapiens
< 2 2 0 >
< 221>
      CDS
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
< 2 2 3 >
< 4 0 0 > 3 7
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
```

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala

1 0

5

1

4 8

	,				,							,				0.0
	ctg															9 6
Ala	Leu	Сус		Leu	V a I	His	Ser		His	V a I	Phe	Leu		Pro	GIn	
			2 0					2 5					3 0			
	g c a															1 4 4
GIn	Ala		Ser	Leu	Leu	GIn		V a I	Arg	Arg	Thr		Thr	Ser	Glu	
		3 5					4 0					4 5				
	cag															1 9 2
Туr	Gln	Thr	P h e	P h e	Asn		Arg	Thr	P h e	G 1 y		G 1 y	Glu	Ala	Asp	
	5 0					5 5					6 0					
	ggg															2 4 0
	Gly	Leu	Arg	Pro		Phe	Glu	Lys	Lys		Leu	Glu	Asp	Lys		
6 5					7 0					7 5					8 0	
	aga															288
Glu	Arg	Glu	Leu		Glu	Ser	Туr	Пe		Gly	Arg	Пlе	V a l		Gly	
				8 5					9 0					95		
	g a t															3 3 6
Ser	Asp	Ala		Пlе	Gly	Met	Ser		Trp	Gln	V a l	Met	Leu	Phe	Arg	
			1 0 0					105					1 1 0			
	a g t															3 8 4
Lуs	Ser		Gln	Glu	Leu	Leu		Gly	Ala	Ser	Leu	Пlе	Ser	Asp	Arg	
		115					1 2 0					1 2 5				
	g t c															4 3 2
Trp	V a 1	Leu	Thr	Ala	Ala		Сус	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lуs	
	1 3 0					1 3 5					1 4 0					
	t t c															4 8 0
	Phe	Thr	Glu	Asn		Leu	Leu	V a l	Arg		Gly	Lys	His	Ser	Arg	
l 4 5					150					155					160	
	agg															5 2 8
Thr	Arg	Tyr	Glu		Asn	Пe	Glu	Glu	Пe	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Пe	
				165					170					175		
	a t c															5 7 6
Tyr	Пlе	His		Arg	Tyr	Asn	Trp		Glu	Asn	Leu	Asp		Asp	I 1 e	
			180					185					190			
	ctg															6 2 4
Ala	Leu		Lys	Leu	Lуs	Lys		V a l	Ala	Phe	Ser		Tyr	I I e	His	
		195					200					2 0 5				
	gtg															6 7 2
Pro	V a l	Суѕ	Leu	Pro	Asp		Glu	Thr	Ala	Ala		Leu	Leu	Gln	Ala	
	2 1 0					2 1 5					2 2 0					
	t a c															7 2 0
	Туr	Lys	Gly	Arg		Thr	Gly	Trp	Gly		Leu	Lys	Glu	Thr		
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	
	gcc														a a c	7 6 8
Thr	Ala	Asn	v a l		Lуs	GIy	GIn	Pro		v a l	Leu	GIn	v a l		Asn	
				2 4 5					250					255		0
	C C C															8 1 6
Leu	Pro	Пе		6 L u	Arg	Pr0	v a I		Lys	Asp	S e r	lhr		Пе	Arg	
			260					265					2 7 0			0.0.4
	a c t															8 6 4
Пе	Thr	Asp	Asn	Met	l'h e	Суѕ	Ala	Gly	Tyr	Lуs	Pro	Asp	Glu	Gly	Lуs	

		2 7 5					280					285				
сва	ggg		gcc	t g t	gaa	ggg		g C C	ggg	gga	ССС		gtc	a t g	aag	9 1 2
									Gly							
	290					295					3 0 0					
a g c	$C \; C \; C$	t t t	аас	аас	C g C	t g g	t a t	саа	a t g	ggc	$a\ t\ \varepsilon$	g t c	$t\ \varepsilon\ a$	t g g	g g t	960
Ser	Pro	P h e	Asn	Asn	Arg	Trp	Tyr	Gln	Met	Gly	Пe	V a l	Ser	Trp	Gly	
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
g a a	g g C	t g t	gac	C g g	$g\ a\ t$	ggg	a a a	t a t	g g C	t t c	t a ε	a c a	c a t	g t g	t t c	1008
Glu	Gly	Cys	Asp		Asp	G 1 y	Lys	Туr	G 1 y	P h e	Tyr	Thr	His		Phe	
				3 2 5					3 3 0					3 3 5		
									a t t						t a g	1 0 5 6
Arg	Leu	Lys		Trp	Пlе	Gln	Lys		Пe	Asp	Gln	Phe		Glu		
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			
Z 0 1 A	, ,) ()														
< 2 1 0 < 2 1 1		3 8 3 5 1														
< 211		PRT														
< 2 1 3		Homo	sani	iens												
	, 1	. v m v	5 a p 1													
< 4 0 0	> 3	3 8														
Met	Ala	His	V a l	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Суѕ	Leu	Ala	Leu	Ala	
l				5					1 0					15		
Ala	L e u	Сус	Ser	Leu	V a l	His	Ser	G 1 n	His	V a l	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln	
			2 0					2 5					3 0			
Gln	Ala		Ser	L e u	Leu	Gln	Arg	V a l	Arg	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	
		3 5					4 0					4 5				
		Thr	Phe	P h e	Asn		Arg	Thr	P h e	Gly		Gly	Glu	Ala	Asp	
	5 0					5 5					6 0					
									Lys		Leu	Glu	Asp	Lys		
6 5		0.1												٥.	8 0	
Glu	Arg	Glu	Leu		Glu	Ser	Туr	Пе	Asp	G I y	Arg	Пlе	V a l		G I y	
C			0.1	8.5	0.1		C	D	9 0	0.1		1.6		9 5 D 1		
5 e r	Asp	Ala		1 I e	6 I y	меt	5 e r		Trp	ьIn	v a I			rhe	Arg	
I	C ~	D	100	f 1	I	I	ſ	105	A 1 a	C ^	I ~ ··	Llo		۸	۸ ~	
LÿS	s e r		GIN	ьIU	Lеи			6 I ÿ	Ala	5 e r			ser	A S D	Arg	
ፐェ尔	V a 1	115	ть.	A 1 a	A 1 a		120	I	I	Т		125 Pro	Т	100	I 17 0	
	v a 1 1 3 0	Lец	1 11 [A I d		A 1 a 1 3 5	U y S	ьец	Leu			0 1 1	111	W 2 h	гλ2	
		Th.	6.1 11	Acn			I Δ 11	V a 1	Arg		140	Luc	Hic	Sar	Δια	
145	1 11 6	1 11 1	σιü	Λ 9 II	150	ьcu	ьcu	val		1 5 5	UI)	г 1,2	11 1 2	n c I	160	
	Arσ	Tvr	(, 1 n	Arσ		1 _P	(, 1 n	(, 1 n	I l e		Met	[, e n	(, 1 n	Lvc		
1 11 1	111 8	1 1 1	oru	165	11 o 11	116	viu		170	501	1¥1 € €	ьси	∪ i u	175	116	
Tvr		Hic	Pro		Tvr	Asn	Trn		Glu	Asn	L e 11	Asn	Arg		1 e	
	110	1112	180	111 0	. , 1	11 0 11	p	185	oru	11 0 11	b√u	vr n h	190	"r o h		
A 1 a	Len	Met		Len	Lvs	Lvs	Pro		Ala	Phe	Ser	Asn		I 1 e	His	
	_ , ,	195	_,,	_ , ,	_ , 5	_,,	200	~ .		0	1	205	- , .			
Dro	V a 1		Leu	Pro	Asp	Arg		Thr	Ala	Ala	Ser		Leu	Gln	Ala	
1 1 0		• -		-	r	2 1 5		-			2 2 0				-	
110	2 1 0															
		Lys	Gly	Arg	V a l	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	

Thr Ala Asn	Val Gly Lys	Gly Gln Pro	Ser Val Leu	Gln Val Val	Asn
len Pro Ile	245 Val Glu Arg	Pro Val Cys	250 Lys Asn Ser	255 Thr Arg Ile	Αισ
	2 6 0	2 6 5		2 7 0	
Ile Thr Asp 275	Asn Met Phe	Cys Ala Gly 280	Tyr Lys Pro	Asp Glu Gly 285	Lys
Arg Gly Asp	Ala Cys Glu	Gly Asp Ala			Lys
		295 Trp Tyr Gln		Val Ser Trp	
305 Glu Glv Cvs	310 Asp Arg Asp	Gly Lys Tyr	315 Glv Phe Tvr	Thr His Val	3 2 0 P h e
	3 2 5		3 3 0	3 3 5	
Arg Leu Lys	Lys Trp Ile 340	Gln Lys Val 345	lle Asp Gln	Phe Gly Glu 350	
<210> 39					
<211> 1056 <212> DNA					
	s a p i e n s				
< 2 2 0 >					
<221> CDS					
<222> (1)	(1056)				
< 2 2 3 >					
< 4 0 0 > 3 9					
		ttg cag ctg			
Met Ala His 1		Leu Gln Leu			
		cac agc cag			
Ala Leu Cys	Ser Leu Val 20	His Ser Gln 25	His Val Phe	Leu Ala Pro 30	Gln
caa gca cgg	teg etg ete	cag cgg gtc	cgg cga acc	gcc acc agt	g a g 1 4 4
Gln Ala Arg 35	Ser Leu Leu	Gln Arg Val 40	Arg Arg Thr	Ala Thr Ser 45	Glu
tac cag act	ttc ttc aat	ccg agg acc	ttt ggc tcg	gga gag gca	g a c 1 9 2
Tyr Gln Thr 50	Phe Phe Asn	Pro Arg Thr 55	Phe Gly Ser 60	Gly Glu Ala	Asp
	cga cct ctg	ttc gag aag		gag gac aaa	a c c 2 4 0
		Phe Glu Lys			
6 5	7 0		7 5		8 0
		tcc tac atc			
Glu Arg Glu	Leu Leu Glu 85	Ser Tyr Ile	Asp Gly Arg	Ile Val Glu 95	G 1 y
tcg gat gca	gag atc ggc	atg tca cct	tgg cag gtg	atg ctt ttc	C g g 3 3 6
Ser Asp Ala	Glu Ile Gly 100	Met Ser Pro 105	Trp Gln Val	Met Leu Phe 110	Arg
and nat ccc	gag gag ctg	ctg tgt ggg	gcc agc ctc	atc agt gac	с g с 3 8 4
		Leu Cys Gly 120		Ile Ser Asp 125	Arg

		ctc Leu														4 3 2
Asn	t t c	a c c T h r			Asp	c t t				Пlе	g g C				Arg	480
		t a c T y r												Lys		5 2 8
		сас Ніs		agg			Trp	Arg	gag				Arg			5 7 6
		atg Met 195	a a g				$\mathfrak{c} \mathfrak{c} \mathfrak{t}$									6 2 4
	g t g V a l 2 1 0				g a c A s p		gag					t t g				672
G 1 y	t a c	aag Lys			Val	a c a				Asn	c t g				Trp	7 2 0
		a a c A s n		G 1 y					Ser					V a l		768
		att Ile	V a 1					Cys					Arg			816
	Thr	g a c A s p	Asn	Met	P h e	Суѕ	Ala	Gly			Pro	Asp				8 6 4
сgа Arg	g g g	2 7 5 g a t A s p	g C C	t g t	g a a	ggg		g C C			c c c					9 1 2
agc Ser 305	ссс	t t t P h e			c g c A r g 3 1 0	t g g					a t c					960
gaa		t g t C y s			g a t					t t c					t t c	1008
		aag Lys		t g g	ata Ile				a t t					gag	t a g	1 0 5 6
< 2 1 C)	4 0 3 5 1														
< 2 1 3 < 2 1 3		PRT Homo	sap	iens												

< 4 0 0 > 4 0

Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala

1		5			1 0			15	
Ala Leu	Cys Ser 20	Leu Val	His Ser				Leu Al 30	a Pro	Gln
Gln Ala	Arg Ser 35	Leu Leu	Gln Arg 40	Val.		g Thr	Ala Th 45	r Ser	Glu
Tyr Gln 50	Thr Phe	Phe Asn	Pro Arg 55			y Ser 60	Gly Gl	u Ala	Asp
Cys Gly 65	Leu Arg	Pro Leu 70	Phe Glu		Lys Se 75		Glu As	p Lys	T h r 8 0
Glu Arg	Glu Leu	Leu Glu 85		Ile.	Asp Gl 90	y Arg	Ile Va	1 G 1 u 9 5	G 1 y
Ser Asp	Ala Glu 100	Ile Gly			Trp Gl				Arg
Lys Ser		Glu Leu		Gly.		r Leu		r Asp	Arg
Trp Val		Ala Ala	Ala Cys	Leu		r Pro	Pro Tr	p Asp	Lys
Asn Phe 145		Asn Asp 150	Leu Leu				Lys Hi	s Ser	Arg 160
Thr Arg		Arg Asn		Lys				u Lys 175	I 1 e
Tyr Ile	His Pro		Asn Trp		Glu As				I 1 e
Ala Leu	Met Lys 195	Leu Lys						r Ile	His
Pro Val 210	Cys Leu	Pro Asp		Thr.		a Ser 220	Leu Le	u Gln	Ala
	Lys Gly	Arg Val 230				n Leu	Lys Gl	u Thr	Trp 240
Thr Ala	Asn Val		Gly Gln				Gln Va	1 Val 255	
Leu Pro	Ile Val 260	Glu Arg	Pro Val	C y s : 2 6 5	Lys As	p Ser	Thr Ar 27		Arg
lle Thr	Asp Asn 275	Met Phe	C y s A 1 a 2 8 0	Gly	Tyr Ly	s Pro	Asp Gl 285	u Gly	Lys
Arg Gly 290	Asp Ala	Cys Glu	Gly Asp 295	Ala	Gly Gl	y Pro 300	Phe Va	l Met	Lys
Ser Pro 305	Phe Asn	Asn Arg 310	Trp Tyr	Gln 1	Met G1 31		Val Se	r Trp	G 1 y 3 2 0
Glu Gly	Cys Asp	Arg Asp 325	Gly Lys		Gly Ph 330	е Туг	Thr Hi	s V a l 3 3 5	P h e
Arg Leu	Lys Lys 340		Gln Lys			p Gln	Phe G1 35	y Glu	
<210> 4	1								

< 2 1 0 > < 2 1 1 > 1056

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Homo sapiens

```
< 2 2 1 >
      CDS
\langle 222 \rangle (1).. (1056)
< 223>
<400>
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                 4.8
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
               5
                            1 0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                 96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
           2 0
                          2 5
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                 1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                          4 0
       3 5
                                             4 5
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
                                                                 192
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
   5 0
                      5 5
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                 2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
65 70 75
                                                                 288
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
               8.5
                                 9 0
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
                                                                 3 3 6
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
         100
                          105
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
                                                                 384
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
       115
                  1 2 0
tgg gtc ctc acc gcc gcc cac tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                 4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
130
                  1 3 5
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc aag cac tcc cgc
                                                                 480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
   150
1 4 5
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc
                                                                 5 2 8
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                  170
           165
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gcc att
                                                                 5 7 6
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Ala Ile
         180
                          185
gcc ctg atg aag ctg aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac
                                                                 6 2 4
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
       195
                          200
                                             205
cct gtg tgt ctg ccc gac agg gag acg gca gcc agc ttg ctc cag gct
                                                                 6 7 2
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
           2 1 5
   2 1 0
                                         2 2 0
                                                                 7 2 0
gga tac aag ggg cgg gtg aca ggc tgg ggc aac ctg aag gag acg tgg
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
```

2 4 0

225

2 3 0

	g c c a a c												a a c	7 6 8
	Ala Asr		2 4 5				250					V a l 2 5 5	Asn	
	ccc att Pro Ile	V a l				Cys					Arg	atc Ile		8 1 6
	act gad													8 6 4
lle	Thr Asp 275				280					285				
сgа Arg	Gly Asp		tgt gaa Cys Gli	1 G 1 y					Pro					9 1 2
a g c	290 ccc ttt	a a c	aac cg	295 tgg	tat	саа	a t g	g g C	3 0 0 a t c	gtc	t c a	t g g	ggt	960
Ser 305	Pro Phe	Asn.	Asn Ara		Tyr	Gln	Met	G 1 y 3 1 5	I I e	V a l	Ser	Trp	G 1 y 3 2 0	
	ggc tgt Gly Cys												t t c P h e	1008
СВС	ctg aag		325 tgg ata	ı cag	aag	gtc	3 3 0 a t t	gat	cag	ttt	gga	335 gag	t a g	1056
Arg	Leu Lys	L y s 3 4 0	Trp Ile	e Gln	Lys	V a 1 3 4 5	I 1 e	Asp	Gln	P h e	G 1 y 3 5 0	Glu		
< 2 1 0 < 2 1 1														
< 2 1 2														
< 2 1 3	3 > Homo	sapi	e n s											
		sapi	e n s											
< 4 0 (Val.		Leu	Gln		Pro 10	G 1 y	Суѕ	Leu	Ala	Leu 15	Ala	
< 4 0 (M e t	0 > 42	Val.	Arg Gly 5				1 0					15		
< 4 0 0 M e t l A l a	0> 42 Ala His Leu Cys Ala Arg	V a l S e r 2 0	Arg Gly 5 Leu Val	His	Ser Arg	G 1 n 2 5	10 His	V a l	P h e	L e u A l a	A 1 a 3 0	15 Pro	Gln	
< 4 0 0 Me t 1 Ala Gln	0 > 42 Ala His Leu Cys Ala Arg 35 Gln Thr	Val Ser 20 Ser	Arg Gly 5 Leu Val Leu Leu	His Gln Pro	Ser Arg 40	G 1 n 2 5 V a 1	1 0 H i s A r g	V a l A r g	Phe Thr	Leu Ala 45	A 1 a 3 0 T h r	15 Pro Ser	Gln Glu	
< 4 0 0 0 M e t A 1 a G 1 n T y r C y s	0 > 42 Ala His Leu Cys Ala Ara 35	Val Ser 20 Ser	Arg Gly 5 Leu Vai Leu Leu Phe Asi Pro Leu	His Gln Pro 55	Ser Arg 40 Arg	G 1 n 2 5 V a 1 T h r	1 0 H i s A r g P h e	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr	15 Pro Ser Ala	Gln Glu Asp	
< 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s 6 5	0 > 42 Ala His Leu Cys Ala Ara 35 Gln Thr 50	Val Ser 20 Ser Phe Arg	Arg Gly 5 Leu Vai Leu Leu Phe Asi Pro Leu 70 Leu Gly	His Gln Pro 55	Ser Arg 40 Arg	G 1 n 2 5 V a 1 T h r L y s	10 His Arg Phe Lys	Val Arg Gly Ser	Phe Thr Ser 60 Leu	Leu Ala 45 Gly	Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys Glu	Gln Glu Asp Thr	
<pre>< 4 0 0 M e t 1 A l a G l n T y r C y s 6 5 G l u</pre>	Ala His Leu Cys Ala Ara 35 Gln Thr 50 Gly Leu	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu	Arg Gly 5 Leu Vai Phe Asi Pro Leu 70 Leu Glu 85	His Gln Pro 55 Phe	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e	10 His Arg Phe Lys Asp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu Ile	Ala 30 Thr Glu Asp	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
<pre>< 4 0 0 M e t 1 A l a G l n T y r C y s 6 5 G l u S e r</pre>	Ala His Leu Cys Ala Ara 35 Gln Thr 50 Gly Leu Arg Glu	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln	Arg Gly 5 Leu Va: Phe Asi Pro Leu 70 Leu Glu 85	His Gln Pro 55 Phe Ser Met	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser	G 1 n 2 5 V a 1 Th r L y s I 1 e P r o 1 0 5	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly	Phe Thr Ser 60 Leu Arg	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met	A 1 a 3 0 T h r G 1 u A s p V a 1 L e u 1 1 0	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly	
<pre>< 4 0 0 Me t 1 A 1 a G 1 n T y r C y s 6 5 G 1 u S e r L y s</pre>	Ala His Leu Cys Ala Arg 35 Gln Thr 50 Gly Leu Arg Glu Asp Ala	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln	Arg Gly 5 Leu Va: Leu Leu Phe Asr 70 Leu Glu 85 Ile Gly	His Gln Pro 55 Phe Ser Met	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120	G 1 n 2 5 V a 1 Thr Lys I 1 e Pro 1 0 5 G 1 y	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg	
<pre><400 Met I Ala Gln Tyr Cys 65 Glu Ser Lys Trp</pre>	Ala His Leu Cys Ala Arg 35 Gln Thr 50 Gly Leu Arg Glu Asp Ala Ser Pro	Val Ser 20 Ser Phe Arg Leu Glu 100 Gln	Arg Gly 5 Leu Va: Leu Leu Phe Asr 70 Leu Gly 85 Ile Gly Glu Leu Ala Ala	His GIn Pro 55 Phe Ser Leu His 135	Ser Arg 40 Arg Glu Tyr Ser Cys 120 Cys	G 1 n 2 5 V a 1 Th r L y s I 1 e P r o 1 0 5 G 1 y L e u	10 His Arg Phe Lys Asp 90 Trp	Val Arg Gly Ser 75 Gly Gln Ser Tyr	Phe Thr Ser 60 Leu Arg Val Leu Pro 140	Leu Ala 45 Gly Glu Ile Met Ile 125 Pro	Ala 30 Thr Glu Asp Val Leu 110 Ser	15 Pro Ser Ala Lys Glu 95 Phe Asp	Gln Glu Asp Thr 80 Gly Arg Lys	

```
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Ala Ile
                185
           180
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
                           200
                                               205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
                       2 1 5
                                           2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
                   230
                                      235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                2 4 5
                                    250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        2 7 5
                           280
                                               285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                       295
                                            3 0 0
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
3 0 5
                  3 1 0 3 1 5
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
               3 2 5 3 3 0
Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
            3 4 0
                               3 4 5
                                                   3 5 0
< 2 1 0 > 4 3
<211> 1056
< 2 1 2 > DNA
<213> Homo sapiens
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
     CDS
< 2 2 2 >
      (1)...(1056)
< 2 2 3 >
\langle 4 \ 0 \ 0 \rangle \qquad 4 \ 3
                                                                    4.8
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                5
                                   1.0
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
                                                                     96
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
            2.0
                                25
                                                   3.0
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                     1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
        3 5 4 0
                                                                    192
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5 0
                       5 5
                                            6.0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag tcg ctg gag gac aaa acc
                                                                    2 4 0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
     7 0
                        7 5
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                    288
```

Glu	Arg	Glu	Leu	Leu 85	Glu	Ser	Туr	I I e	A s p	G 1 y	Arg	I 1 e	V a l	G 1 u	Gly	
				$a\ t\ c$					t g g T r p					t t c		3 3 6
			сав					ggg	g c c A l a				a g t	g a c A s p		3 8 4
		\mathfrak{c} t \mathfrak{c}					t g c		ctg Leu			ссс				4 3 2
									cgc Arg							480
									a t a I I e 1 7 0						atc Ile	5 2 8
									gag Glu					-	att Ile	5 7 6
	ctg Leu								g c c A l a							6 2 4
									g c a A l a							672
	t a c T y r		Gly			a c a T h r		Trp	ggc Gly		c t g	aag Lys			t g g T r p 2 4 0	7 2 0
аса	gcc	a a c	g t t		a a g	gggg	сав	c c c	agt Ser 250	g t c					a a c A s n	7 6 8
				gag					aag Lys					atc Ile		816
	a c t T h r								t a c T y r					ggg Gly	aaa Lys	8 6 4
сgа Arg	g g g G l y 2 9 0								ggg Gly							9 1 2
									atg Met						g g t G l y 3 2 0	960
gaa		t g t C y s			g a t				g g c G l y 3 3 0	t t c				gtg Val 335	t t c P h e	1008
		a a g L y s		t g g					a t t I I e					gag	t a g	1056

```
< 2 1 0 >
       4 4
< 2 1 1 >
       351
< 2 1 2 >
       PRT
< 2 1 3 >
       Homo sapiens
< 4 0 0 > 4 4
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                 5
                                      1.0
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
                                  25
            20
                                                       3.0
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                             4 0
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
                         5 5
                                               6.0
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
                     7.0
                                          7 5
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly
                 8.5
                                      9 0
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
            1 0 0
                                  105
                                                       1 1 0
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg
                             1 2 0
                                                   125
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
                        135
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg
                     150
                                          155
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Ala Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                165
                                     170
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
                                 185
Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His
        195
                              200
                                                   205
Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala
    2 1 0
                         2 1 5
                                               2 2 0
Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp
2 2 5
                     2 3 0
                                          235
Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn
                 2 4 5
                                      250
Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg
            260
                                  265
lle Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys
        275
                             280
                                                   285
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ala Gly Gly Pro Phe Val Met Lys
                         295
                                               300
Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly
                                          3 1 5
3 0 5
                     3 1 0
Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe
                 3 2 5
                                      3 3 0
```

Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu

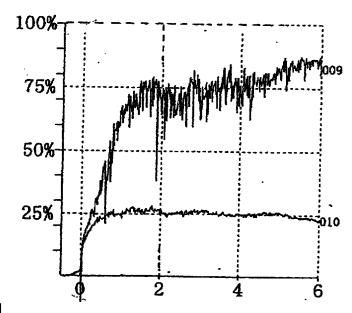
3 4 0 3 5 0

```
< 2 1 0 >
      4.5
<211>
       1056
< 2 1 2 >
       DNA
< 2 1 3 >
       Homo sapiens
< 2 2 0 >
< 2 2 1 >
       CDS
< 2 2 2 >
       (1)...(1056)
< 2 2 3 >
\langle 4 \ 0 \ 0 \rangle \qquad 4 \ 5
atg gcg cac gtc cga ggc ttg cag ctg cct ggc tgc ctg gcc ctg gct
                                                                           48
Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala
                                      1.0
                                                                           96
gcc ctg tgt agc ctt gtg cac agc cag cat gtg ttc ctg gct cct cag
Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln
             20
                                  25
caa gca cgg tcg ctg ctc cag cgg gtc cgg cga acc gcc acc agt gag
                                                                          1 4 4
Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Thr Ala Thr Ser Glu
                              4 0
                                                   4.5
                                                                          192
tac cag act ttc ttc aat ccg agg acc ttt ggc tcg gga gag gca gac
Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp
    5 0
                         5.5
                                               6.0
                                                                          2 4 0
tgt ggg ctg cga cct ctg ttc gag aag aag tcg ctg gag gac aaa acc
Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr
6.5
                     7.0
                                           75
gaa aga gag ctc ctg gaa tcc tac atc gac ggg cgc att gtg gag ggc
                                                                          288
Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr lle Asp Gly Arg lle Val Glu Gly
                 8 5
                                      9 0
                                                                          3 3 6
tcg gat gca gag atc ggc atg tca cct tgg cag gtg atg ctt ttc cgg
Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg
                                  105
                                                                          384
aag agt ccc cag gag ctg ctg tgt ggg gcc agc ctc atc agt gac cgc
Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu lle Ser Asp Arg
        115
                              1 2 0
                                                   1 2 5
tgg gtc ctc acc gcc gcc gcc tgc ctc ctg tac ccg ccc tgg gac aag
                                                                          4 3 2
Trp Val Leu Thr Ala Ala Ala Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys
    130
                         135
                                               140
aac ttc acc gag aat gac ctt ctg gtg cgc att ggc gcc cac tcc cgc
                                                                          480
Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Ala His Ser Arg
                     150
                                           155
1 4 5
                                                                          528
aca agg tac gag cga aac att gaa aag ata tcc atg ttg gaa aag atc
Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile
                 165
                                      170
tac atc cac ccc agg tac aac tgg cgg gag aac ctg gac cgg gac att
                                                                          5 7 6
Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile
            180
                                  185
gcc ctg atg aag ctg aag cct gtt gcc ttc agt gac tac att cac
                                                                          6 2 4
```

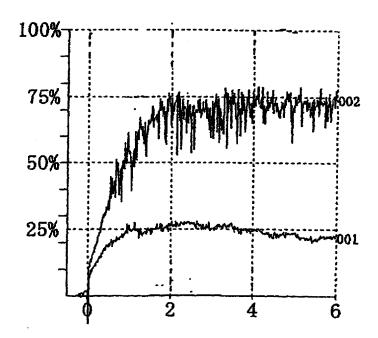
Ala	Leu	Met 195	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro 200	V a l	Ala	P h e	Ser	A s p 2 0 5	Туr	I I e	His	
$c\ c\ t$	gtg	t g t	ctg	c c c	gac	agg	gag	a c g	gca	gcc	a g c	t t g	$c\ t\ c$	cag	gct	672
Pro	Val	Суѕ	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala	
	2 1 0					2 1 5					2 2 0					
gga	t a c	a a g	ggg	Сдд	g t g	аса	ggc	t g g	ggc	a a c	c t g	aag	gag	a c g	t g g	7 2 0
Gly	Туr	Lys	G 1 y	Arg	V a l	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp	
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0	
a c a	gcc	a a c	g t t	g g t	a a g	ggg	сав	$c\ c\ c$	a g t	g t c	c t g	cag	g t g	g t g	a a c	768
Thr	Ala	Asn	V a 1	G 1 y	Lys	G 1 y	Gln	Pro	Ser	V a l	Leu	Gln	V a l	V a l	Asn	
				2 4 5					250					2 5 5		
ctg	$c\ c\ c$	a t t	g t g	gag	Сдд	ССВ	g t c	t g c	a a g	g a c	$t\ c\ c$	асс	Сдд	a t c	c g c	8 1 6
Leu	Pro	Пe	V a l	Glu	Arg	Pro	Val	Сус	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Пе	Arg	
			260					265					270			
	a c t		a a c	a t g	t t c	t g t	gct	ggt	t a c	a a g	cct	gat	gaa	ggg	a a a	864
Пlе	Thr		Asn	Met	P h e	Сус	Ala	Gly	Туr	Lуs	Pro		Glu	Gly	Lys	
		2 7 5					280					285				
c g a							g a c									9 1 2
Arg	Gly	Asp	Ala	Суѕ	Glu		Asp	Ala	Gly	Gly		P h e	Val	Met	Lys	
	290					295					3 0 0					
	CCC						t a t									960
	Pro	P h e	Asn	Asn		Trp	Туr	Gln	Met		Пe	Val	Ser	Trp		
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0	
							a a a								t t c	1008
Glu	Gly	Суѕ	Asp		Asp	GIy	Lys	Tyr		Phe	Tyr	Thr	His		Phe	
				3 2 5	,				3 3 0					3 3 5	4	1050
		aag					aag								t a g	1056
Arg	Leu	Lуs		lrp	He	GIN	Lys		He	Asp	GIN	r n e		Glu		
			3 4 0					3 4 5					3 5 0			
< 21 () >	4 6														
< 2.1.1) .	3 5 1														
< 2.1.2	2 > 1	PRT														
< 2 1 3	3> 1	Homo	sap	iens												
< 4 0 () > -	4 6														
			V a 1	Arg	Glv	Leu	Gln	Leu	Pro	Glv	C v s	L e u	Ala	Leu	Ala	
1				5		_ , ,			1 0			_ , ,		15		
	Leu	Суѕ	Ser		Val	His	Ser	Gln		Val	Phe	Leu	Ala		Gln	
		·	2 0					2 5					3 0			
Gln	Ala	Arg		Leu	Leu	Gln	Arg		Arg	Arg	Thr	Ala		Ser	Glu	
		3 5					4 0					4 5				
Туr	Gln	Thr	P h e	P h e	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	
	5 0					5 5	-			-	6 0	-			-	
Суѕ	Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	P h e	Glu	Lys	Lуs	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	
6 5					7 0					7 5					8 0	
Glu	Arg	Glu	L e u	L e u	Glu	Ser	Туr	I 1 e	Asp	Gly	Arg	I 1 e	Val	Glu	Gly	
				8 5					9 0					9 5		
Ser	Asp	Ala	Glu	I 1 e	Gly	M e t	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	P h e	Arg	
			100					105					110			

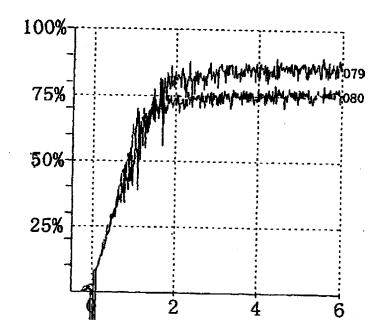
Lys	Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	G 1 y	Ala	Ser	Leu	I 1 e	Ser	Asp	Arg
		115					1 2 0					1 2 5			
Trp	V a 1	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Суѕ	Leu	Leu	Туr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys
	130					135					1 4 0				
Asn	P h e	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	V a l	Arg	Пе	Gly	Ala	His	Ser	Arg
145					150					155					1 6 0
Thr	Arg	Туr	Glu	Arg	Asn	Пe	Glu	Lys	I 1 e	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Пlе
				165					170					175	
Туr	I 1 e	His	Pro	Arg	Tyr	Asn	Trp	Arg	Glu	Asn	Leu	Asp	Arg	Asp	Пlе
			180					185					190		
Ala	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Pro	V a l	Ala	P h e	Ser	Asp	Туr	I 1 e	His
		195					200					205			
Pro	V a l	Сус	Leu	Pro	Asp	Arg	Glu	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Gln	Ala
	2 1 0					2 1 5					2 2 0				
Gly	Туr	Lys	Gly	Arg	V a l	Thr	Gly	Trp	Gly	Asn	Leu	Lys	Glu	Thr	Trp
2 2 5					2 3 0					2 3 5					2 4 0
T h r	Ala	Asn	Val	G 1 y	Lys	Gly	Gln	P r 0	Ser	Val	Leu	Gln	V a l	V a l	Asn
				2 4 5					250					255	
L e u	Pro	Ιlе	Val	Glu	Arg	Pro	Val	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Arg	Пlе	Arg
			260					265					270		
Пlе	Thr	A s p	Asn	Met	P h e	Cys	Ala	Gly	Туr	Lys	Pro	A s p	Glu	Gly	Lys
		2 7 5					280					285			
Arg	Gly	A s p	Ala	Сус	Glu	Gly	A s p	Ala	Gly	Gly	Pro	P h e	Val	Met	Lys
	290					295					3 0 0				
Ser	Pro	Phe	Asn	Asn	Arg	Trp	Туr	Gln	Met	Gly	Пe	V a l	Ser	Trp	Gly
3 0 5					3 1 0					3 1 5					3 2 0
Glu	Gly	Сус	Asp	Arg	Asp	Gly	Lys	Туr	Gly	P h e	Туr	Thr	His	V a l	P h e
				3 2 5					3 3 0					3 3 5	
Arg	L e u	Lys		Trp	Пlе	Gln	Lys		II e	Asp	Gln	P h e		Glu	
			3 4 0					3 4 5					3 5 0		

【書類名】図面【図1】

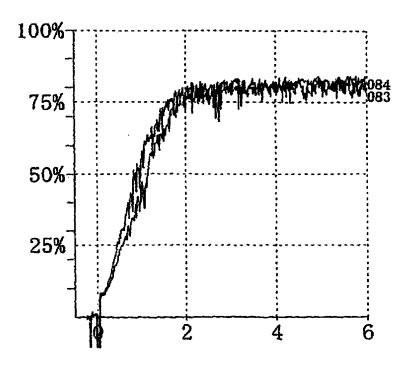


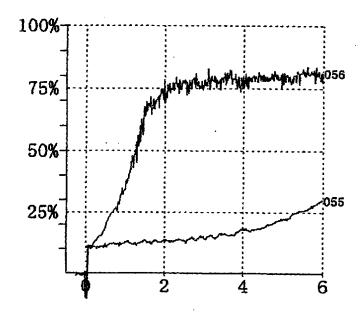
【図2】



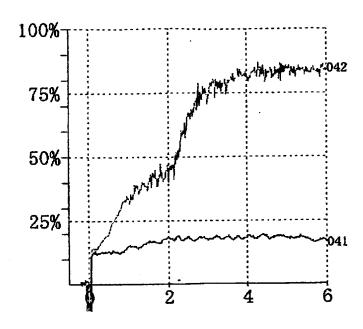


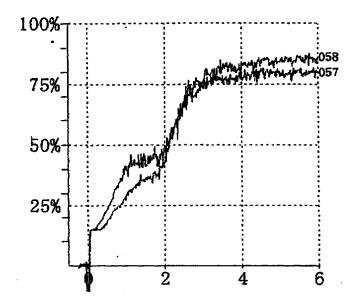
【図4】



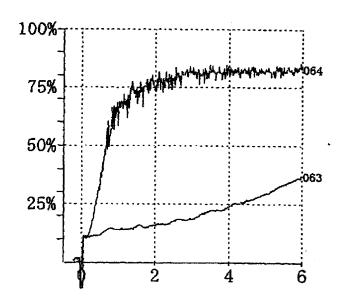


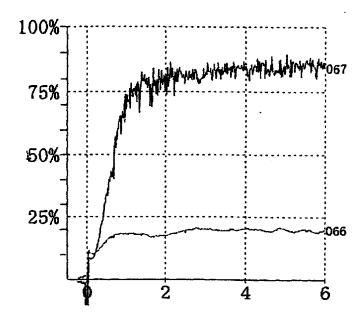
【図6】



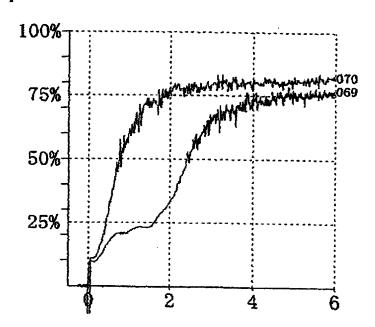


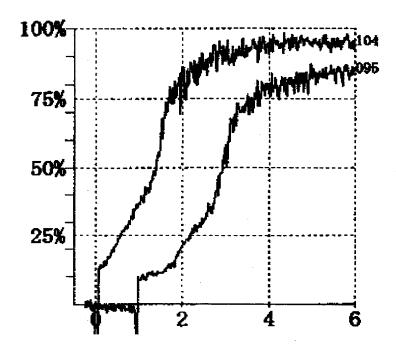
【図8】



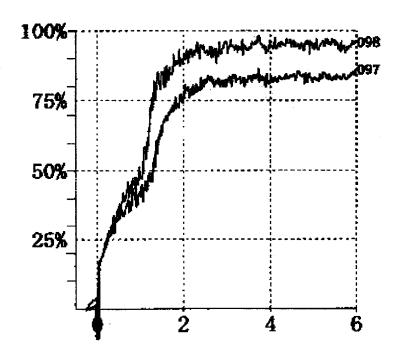


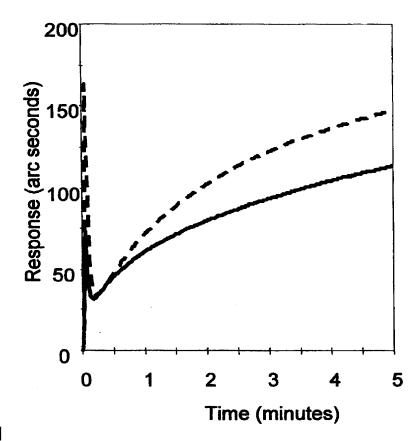
【図10】



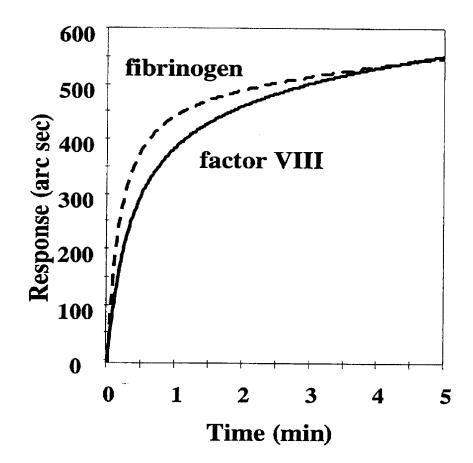


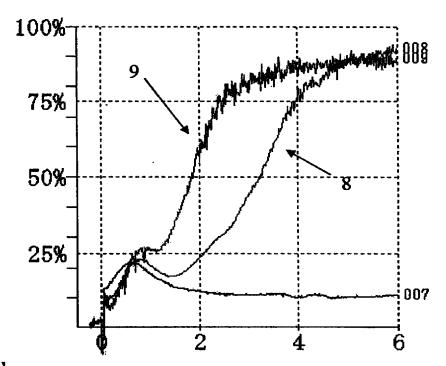
【図12】



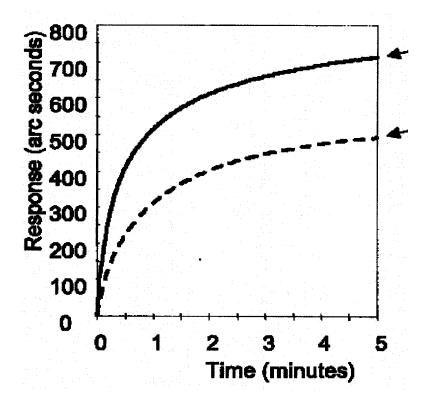


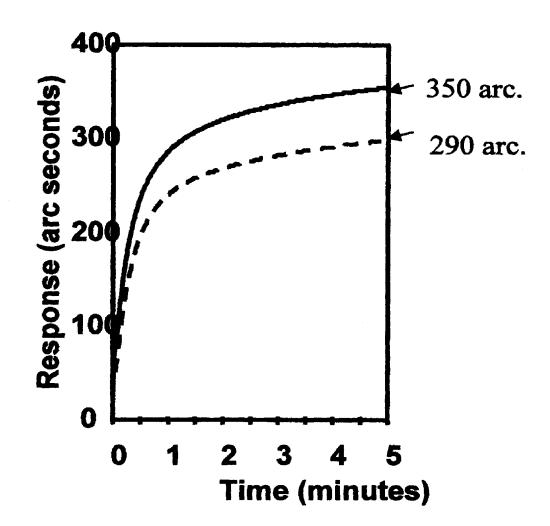
【図14】

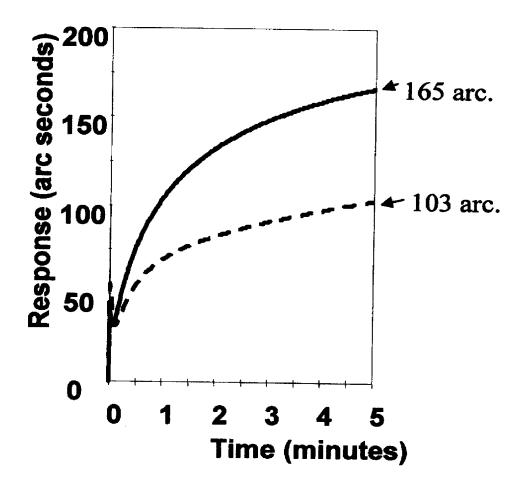


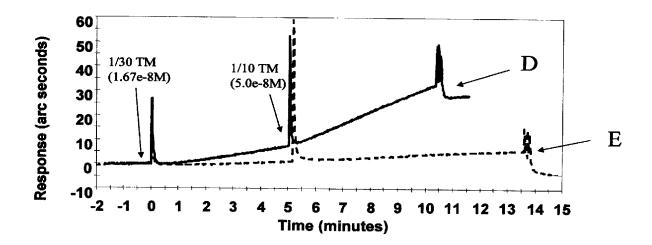


【図16】

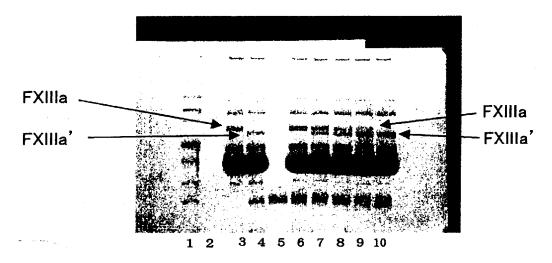


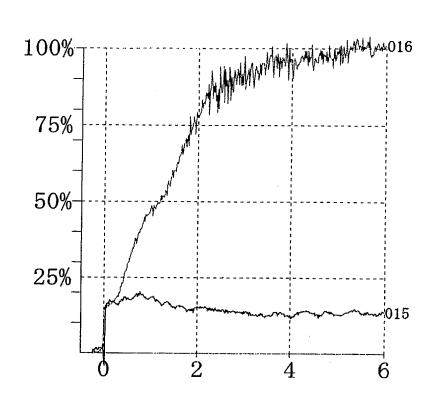




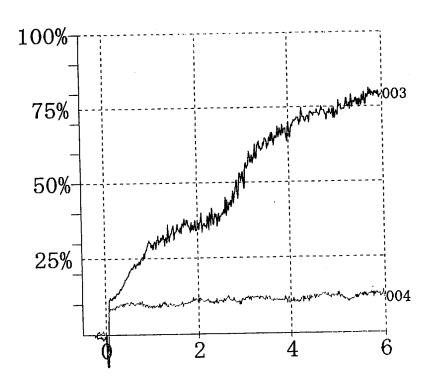


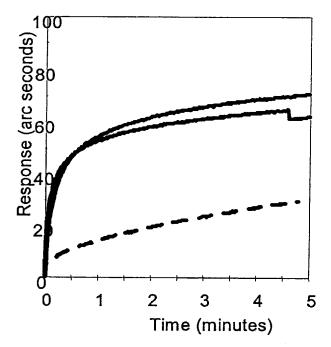
【図20】



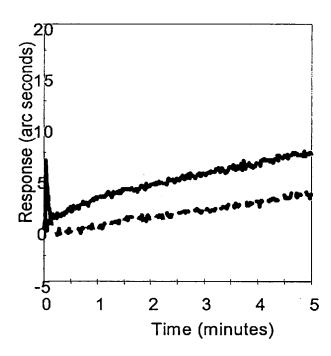


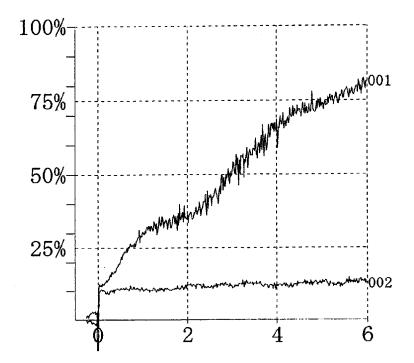
【図22】



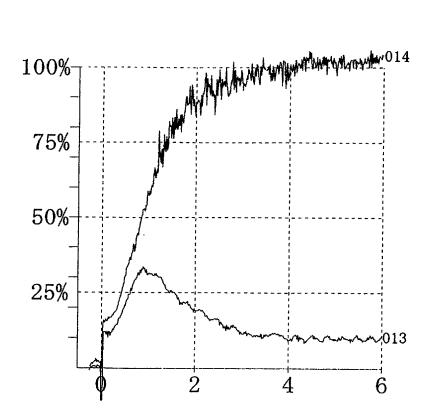


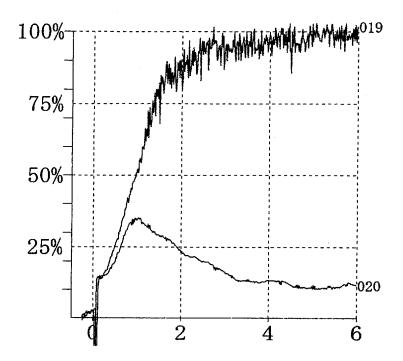
【図24】



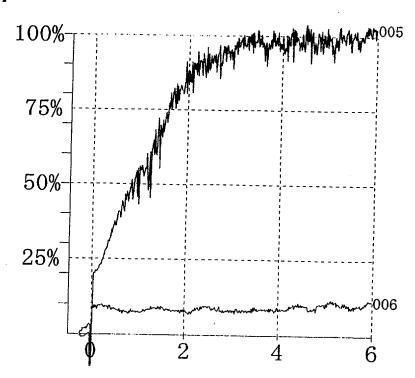


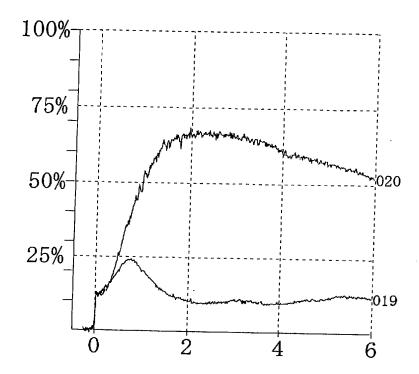
【図26】



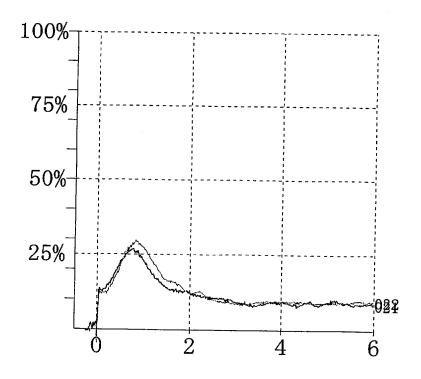


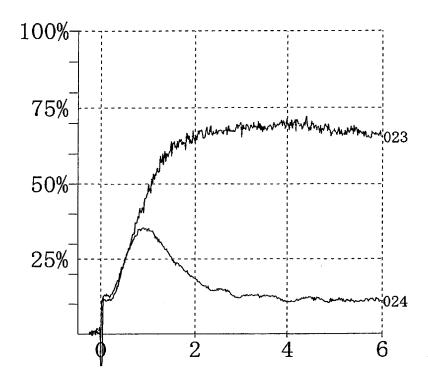
【図28】



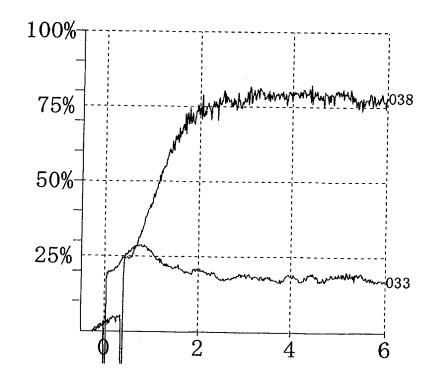


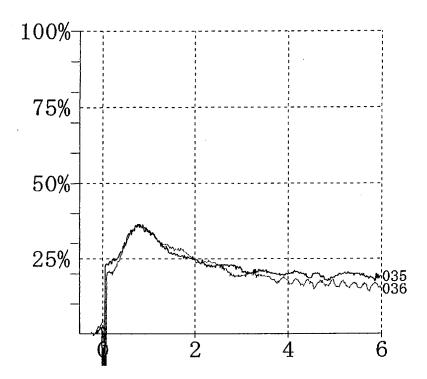
【図30】



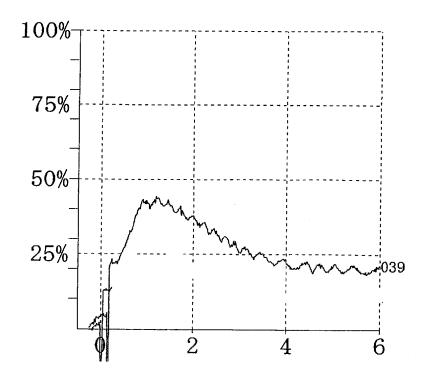


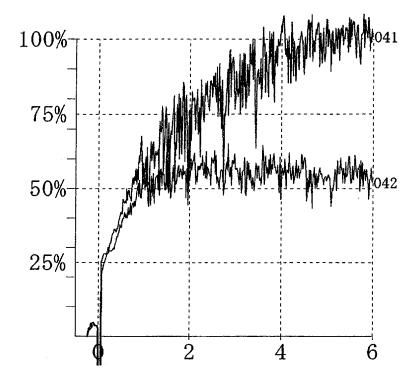
【図32】



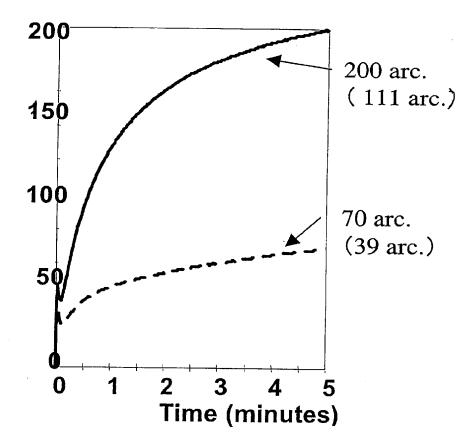


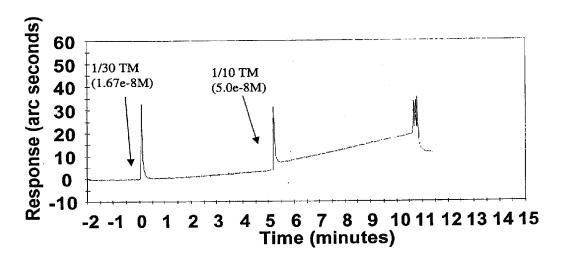
【図34】





【図36】





【書類名】要約書

【要約】

【課題】 抗血栓治療薬又は抗炎症治療薬として好適なトロンビン誘導体を提供する。

【解決手段】 トロンビンにアミノ酸置換を導入し、アミノ酸置換トロンビン誘導体の中から基質分解活性が低下し、かつ基質結合能を保持したトロンビン誘導体を選択する。 具体的にはB鎖203グリシン及びB鎖205セリン及びB鎖43ヒスチジン及び99アスパラギン酸が置換されたトロンビン誘導体及びそのカルボキシル基修飾体などを選択する。

【選択図】 図1

【書類名】 手続補正書 【整理番号】 P-C50037HI 【提出日】 平成17年 3月 2日 【あて先】 特許庁長官殿 【事件の表示】 【出願番号】 特願2005- 29360 【補正をする者】 【識別番号】 0 0 0 0 0 2 0 7 1 チッソ株式会社 【氏名又は名称】 【補正をする者】 【識別番号】 0 0 0 2 2 4 1 0 1 【氏名又は名称】 藤森工業株式会社 【代理人】 【識別番号】 100100549 【弁理士】 【氏名又は名称】 川口 嘉之 【発送番号】 0 1 6 4 8 5 【手続補正】 【補正対象書類名】 特許願 【補正対象項目名】 代理権を証明する書面 【補正方法】 追加 【補正の内容】

【物件名】

【提出物件の目録】

委任状]

委任状

* 平成 /7 年 2月 /日

私は、

識別番号 100100549 弁理士 川 口 嘉 之 氏 識別番号 100090516 弁理士 松 倉 秀 実 氏 識別番号 100089244 弁理士 遠 山 勉 氏 を以て、代理人として下記事項を委任します。

記

1. 特許願

に関する手続

特願 2004 - 80950 特願 2004 - 217834 特願 2004 - 31563/

- 1. 上記出願又は 特願 ユの4 2/7834 特願 ユの64 3/5 に基づく特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張及びその取下げ
- 1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
- 1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
- 1. 上記出願に係る特許権、実用新案権及び意匠権に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄
- 1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は実用新案登録に対する登録異議の申立てに関する手続
- 1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録及び意匠登録に対する無効審判の請求に関する手続
- 1. 上記出願に係る特許権に関する訂正審判の請求
- 1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
- 1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
- 1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所 (居所)

氏名 (名称)

東京都中央区4本橋馬哈町1丁目4番16号 藤森工業株式会社 代表取締役社長 藤 森 明 彦

(代 表 者)





出願人履歴

0000000207119900823

大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号 チッソ株式会社 0000224101 19900830 新規登録 597072349

東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番16号藤森工業株式会社